

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE SCHÄDIGUNG
UND DAS REPARATURVERMÖGEN VON
H. Ep. 2 - ZELLEN NACH UV - UND
RÖNTGENBESTRAHLUNG**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
ARMIN LANDECK
aus Widminnen

Berlin 1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550817_0040

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE SCHÄDIGUNG
UND DAS REPARATURVERMÖGEN VON
H. Ep. 2 - ZELLEN NACH UV - UND
RÖNTGENBESTRAHLUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
ARMIN LANDECK
aus Widminnen

Berlin 1972



Referent: Prof. Dr. rer. nat. Dieter Hartmann

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Martin Wenzel

Tag der mündlichen Prüfung: 4. 5. 1972

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der Freien Universität Berlin unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dieter Hartmann ausgeführt.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Dieter Hartmann für die Überlassung der Arbeit und die großzügige Unterstützung meinen verbindlichsten Dank sagen.

Herrn Prof. Dr. K.-O. Habermehl, Städt. Wenckebach-Krankenhaus, Berlin-Tempelhof, und Herrn Prof. Dr. Voß, Robert-Koch-Institut, Berlin, sage ich meinen verbindlichen Dank für die großzügige Überlassung der Zellkulturen sowie für wertvolle Hinweise und Anregungen.

Herrn Prof. Dr. M. Wenzel danke ich für wertvolle Hinweise zur Radioaktivitäts-Messung und Herrn Prof. Dr. Fuchs, Institut für medizinische Statistik, danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Inhaltsübersicht

	Seite
Abkürzungen	7
A. Einleitung	
I. Erläuterungen zur Strahlenwirkung in Bakterien	8
1. UV-Photoprodukte der Pyrimidine	8
2. Photoprodukte der Purine	11
3. Schädigung und Reparatur nach UV-Strahlung	11
a. Photoreaktivierung	12
b. Dunkelreparatur	14
4. Schädigung und Reparatur nach Röntgenbe- strahlung	19
a. Angriffspunkt ionisierender Strahlung in der Zelle	19
b. Erläuterungen zur Wirkung ionisierender Strahlung	21
1. Entwicklung eines Strahlenschadens	21
2. Strahlenchemie des Wassers	22
3. Strahlenprodukte der Purine u. Pyrimidine	24
4. Chemische Veränderungen in der DNS	25
c. Reparatur von Röntgenschäden in Bakterien	27
II. Erläuterungen zur Strahlenwirkung in Säugetier- Zellen	28
1. Schädigung und Reparatur nach UV-Strahlung	28
a. Inhibitoren zur Aufdeckung von Dunkel- reparaturprozessen	29
b. Erfassung der Überlebensrate	32
c. Reparatur-Replikation und außerplanmäßige DNS-Synthese	33
d. Excision von Pyrimidin-Dimeren	37
2. Schädigung und Reparatur nach Röntgenbe- strahlung	41
B. Ziel der eigenen Untersuchungen	45

C. Material und Methodik

1. Züchtung der Zellen	47
2. Zubereitung der Trypsin-AEDTA-Lösung	48
3. Sterilitätskontrollen	49
4. Markieren der Zellen	50
5. Strahlenquellen und Dosimetrie	50
6. Dosis-Effekt-Kurven	52
7. Anwendung von Inhibitoren	54
8. Nachweis von dimerem Thymin	54
a. Bestrahlen der Zellen	54
b. Aufarbeiten der Zellen	55
c. Chromatographie	56
d. Herstellung von dimerem Thymin	57
9. Radioaktivitätsmessung	58
10. Bestimmung der Einbaurate und des DNS-Abbaus markierter Zellen	59

D. Ergebnisse

I. Definitionen	61
II. Untersuchung der Kolonieformfähigkeit der Zellen	62
III. Nachweis einer Reparatur von Strahlenschäden mit Hilfe von Wachstumskurven	64
1. Untersuchung der Zellproliferation	65
a. Hemmung durch Coffein und Oxyharnstoff	65
b. Hemmung der Proliferation durch UV- und Röntgenstrahlung	68
2. Untersuchungen mit Hilfe der Kolonieformfähigkeit	70
a. Wirkung von Coffein	70
b. Untersuchung der Wirkung von Oxyharnstoff auf die Kolonieformfähigkeit	74
c. Nachweis einer Reparatur von UV-Schäden	76
d. Wirkung von Oxyharnstoff auf UV-bestrahlte H. Ep. 2 - Zellen	81
e. Nachweis einer Reparatur von Röntgenschäden	84

IV. Biochemischer Nachweis von Reparaturprozessen	89
1. Aufbereitung des Trifluoressigsäurehydrolysats zur Papierchromatographie	89
2. Nachweis einer Eliminierung UV-induzierter Pyrimidin-Dimere	91
3. Nachweis einer außerplanmäßigen DNS-Synthese	101
4. Bestimmung des DNS-Abbaus nach UV- und Röntgenbestrahlung	104
E. Diskussion	
1. Beurteilung der Bezugssysteme	107
a. Kolonieformfähigkeit	107
b. Radioaktivitätsmessung	107
c. Statistische Prüfung der Dimeren-Abnahme	109
2. Beurteilung der Ergebnisse	111
a. Eliminierung von Pyrimidin-Dimeren	111
b. DNS-Abbau	113
c. Erfassung der außerplanmäßigen DNS-Synthese	116
d. Nachweis einer Reparatur mit Hilfe der Kolonieformfähigkeit	118
3. Schlußfolgerungen	125
F. Zusammenfassung	126
G. Literaturverzeichnis	128

Abkürzungen

TT	=	Thymin - Dimer
UU	=	Uracil - Dimer
UT	=	Uracil - Thymin - Mischdimer
XT	=	Gesamtaktivität in der Dimeren-Region der Chromatogramme
DAR	=	Dunkelreparatur (dark repair)
TCE	=	Trichloressigsäure
PBS	=	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
AEDTA	=	Äthylendiaminetetraessigsäure
TdR	=	Thymidin
³ H-TdR	=	Tritium-markiertes Thymidin
5-BU	=	5-Bromuracil
5-BUdR	=	5-Bromdesoxyuridin
HU	=	Oxyharnstoff (Hydroxyurea)
mM/l	=	millimolar
XP	=	Xeroderma pigmentosum

A. Einleitung

I. Erläuterungen zur Strahlenwirkung in Bakterien

1. UV-Photoprodukte der Pyrimidine

Einen wesentlichen Schritt zur Erfassung der Wirkung des ultravioletten Lichtes auf molekularer Ebene bedeutete die Darstellung von dimerem Thymin (TT) durch Beukers, Ylstra und Berends (1) im Jahre 1958 durch UV-Bestrahlung einer gefrorenen Thyminlösung und Isolierung der Substanz. In der gefrorenen Thyminlösung wurde die Stellung der Pyrimidine in der DNS-Helix des Watson-Crick-Modells durch Fixierung der Pyrimidin-Moleküle nachgeahmt. 1960 wurde die Struktur des dimeren Thymins aufgeklärt (2), Abb. 1.

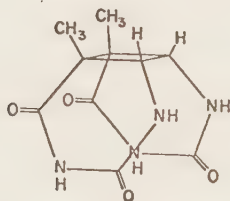


Abb. 1: Dimeres Thymin

In der Folgezeit konnten durch die UV-Bestrahlung gefrorener Lösungsgemische sowohl dimeres Uracil (UU) als auch Mischdimere zwischen Thymin und Uracil (UT) dargestellt

werden (3-5). Die Dimeren-Bildung erfolgt auch zwischen Nucleosiden und Nucleotiden des Uracils und Thymins (3,4,6). Mischdimere zwischen Thymin und Cytosin wurden in der DNS bislang nur als Uracil-Thymin-Dimeres nachgewiesen, das durch Desaminierung des Cytosin-Anteils entsteht (7). Der Nachweis von Cytosin-Dimeren durch UV-Bestrahlung gefrorener Cytosinribosid-Lösung gelang Varghese erst 1971 (9).

Die Trennung der vier theoretisch möglichen isomeren Thymin-Dimere gelang Weinblum und Johns im Jahr 1966 (10), während sie gleichzeitig zeigen konnten, daß aus UV-bestrahlter DNS nach Säurehydrolyse isoliertes TT nur die Form I (s. u.) aufweist, die unter Berücksichtigung ihrer Entstehung aus zwei benachbarten Thymin-Molekülen innerhalb eines DNS-Strangs auch zu erwarten ist. Die vier theoretisch möglichen Stereoisomere des dimeren Thymins sind in Abbildung 2 wiedergegeben.

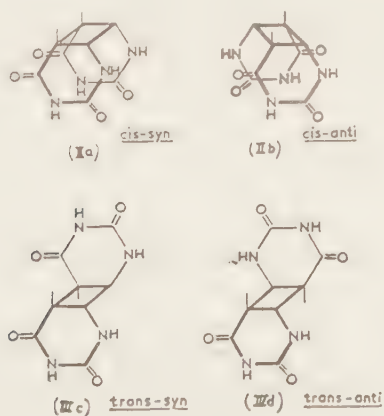


Abb. 2 : Vier stereoisomere Dimere des Thymins
(nach Wulrf und Fraenkel, 51)

Ebenso konnte Weinblum (8) 1967 zeigen, daß die Strukturen von dimerem Uracil und gemischten Uracil-Thymin-Dimeren aus UV-bestrahlter DNS ebenfalls in Form I vorliegen.

Durch Röntgenstrahlen werden keine Dimeren erzeugt (11), da sich die Mechanismen der Energieübertragung von UV- und Röntgenstrahlung wesentlich unterscheiden (s.u.).

Ferner sind als UV-Bestrahlungsprodukte Wasseraddukte von Uracil und Cytosin bekannt (8, 12), Abb. 3.

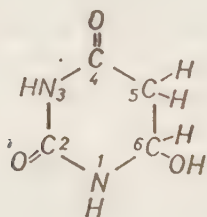


Abb. 3: 5-Hydro-6-hydroxyuracil

Additionsverbindungen mit Aminosäuren sind weitere photochemische Verbindungen der Pyrimidine. So konnte Smith (13) 1962 und 1964 (14) zeigen, daß es bei der UV-Bestrahlung von Bakterien zur photochemischen Induktion von Verbindungen zwischen DNS und umgebenden Protein kommt. In vitro konnte Smith (15, 16) die Modellverbindungen 5-S-Cystein-6-hydrouracil und 5-S-Cystein-6-hydrothymin darstellen. Außerdem konnte er bei der Untersuchung von 22 Aminosäuren nachweisen, daß sich 11 photochemisch mit Uracil verbanden, wenn sie in wäßriger Lösung mit UV-Licht

bestrahlt wurden. Dabei reagierten nicht nur schwefelhaltige, sondern auch aliphatische, aromatische und basische Aminosäuren.

2. Photoprodukte der Purine

Den Untersuchungen der UV-Strahlenwirkung auf die Pyrimidine folgte eine Untersuchung der in der DNS vorkommenden Purine. Dabei stellte sich heraus, daß die Purine keine Dimeren bilden und daß zur photochemischen Veränderung der Purinmoleküle etwa zehnfach höhere Strahlendosen erforderlich sind als bei Pyrimidinen (12). Hieraus zog man den Schluß, daß die Photochemie der Purine biologisch unbedeutend sei, da vor Bildung von Purin-Photoprodukten bereits eine Inaktivierung der biologischen Systeme durch Pyrimidinschäden erfolgt ist. Allerdings kann durch Energietransfer die von Purinen absorbierte Energie sowohl auf die Pyrimidine als auch auf die Zucker-Phosphat-Bindungen der DNS übertragen werden und so eine chemische Veränderung hervorgerufen werden.

3. Schädigung und Reparatur nach UV-Bestrahlung

Nach der Hydrolyse UV-bestrahlter Bakterien, deren DNS mit Thymin-2-¹⁴C markiert war, fanden Wacker, Dellweg und Weinblum (17) im Jahre 1960 eine Verbindung, die 1961 von dieser Arbeitsgruppe als dimeres Thymin identifiziert wurde (4). 1962 konnten Setlow und Setlow (18) den Beweis erbringen, daß dimeres Thymin die Hauptursache der letalen Wirkung der UV-Strahlung ist. Danach konnten in vielen DNS- und RNS-haltigen biologischen Systemen (19-23) nach UV-Bestrahlung Pyrimidin-Dimere nachgewiesen werden, wobei die Suche nach Reparaturmechanismen im Vordergrund

stand. In der Folgebild wurden zwei Vegetationswechseln gefunden, die Dunkelregeneration und die Photoreaktivierung.

3. a. Photoreaktivierung

Unter Photoreaktivierung versteht man die Wiederherstellung eines biologischen Systems nach seiner Zerstörung durch UV-Strahlung unter Verwendung anderer nicht-ionisierender Strahlung (34). Nelson (35) sagt: Die Definition ist, indem sie fordert, daß die der UV-Strahlung folgende Regenerationsstrahlung eine Wellenlänge zwischen 3800 und 4400 Å haben soll.

Von der Photoreaktivierung abgegrenzt ist der Photoschutzeffekt (photoprotection effect), unter dem man die Abnahme der UV-Schädlichkeit eines biologischen Systems durch vorherige Bestrahlung mit Licht versteht (36).

Die ersten Hinweise auf das Phänomen der Photoreaktivierung kamen bis in das Jahr 1934 (37) unberücksichtigt worden. Seine Bedeutung wurde von Nelson (38) 1944 bei Untersuchungen an Keimlingen von *Sinapis alba* sowie von Bicknell 1950 (39) bei der UV-Bestrahlung von Bakterienkulturen erkannt. Erst die Wirkung der UV-Strahlung ($\lambda < 300 \text{ nm}$) bei anschließender Wiederbelebung mit "Licht" (380-440 nm) die zu ca. 90 % wieder aufgehooben werden können, wurde hinsichtlich der biologischen Reaktion geprüft. Es ist Tieren, Bakterien, Algen, Pilzen und Protozoen (40).

Bei der Photoreaktivierung lassen sich zwei unterschiedliche Reaktionsformen abgrenzen:

- a. Direkte photosynthetische Reaktion des Photosystems. Rupert 1960, 1961, 1962 (41-43). Die Wirkung

photoenzymatische Reparatur stellt den häufigsten Mechanismus in Bakterien und Bakteriophagen dar.

β. Indirekte Photoreaktivierung, Jagger und Stafford 1965, (25) Setlow 1966 (17).

α. Photoenzymatische Reparatur:

Die Photoenzymatische Reparatur UV-geschädigter DNS wurde 1949 von Dulbecco (29) dadurch festgestellt, daß UV-inaktivierte Bakteriophagen nur dann einer Photoreaktivierung unterzogen werden konnten, wenn sie zuvor ihre Wirtszellen infiziert hatten. Das zur Reparatur notwendige System mußte also in den Wirtszellen enthalten sein. Dieses lichtabhängige "Photoreaktivierungsenzym", das sowohl Phagen-DNS als auch die DNS der Wirtszellen reaktivieren konnte, wurde 1958 und 1960 von Rupert und Mitarbeitern (22, 34) extrahiert und untersucht. Es vermag unter Lichteinwirkung die transformierende Aktivität von Bakterien-DNS oder die Infektiosität von Virus-DNS wiederherzustellen, die zuvor durch UV-Einwirkung inaktiviert worden waren.

Das Enzym kann aus Bäckerhefe (35) oder aus *Escherichia coli* (36) isoliert werden. Es verbindet sich bereits im Dunkeln mit den UV-geschädigten Regionen der DNS zu einem Komplex, der sich durch Zentrifugation und Säulenchromatographie nachweisen läßt. Mit unbestrahlter DNS verbindet es sich nicht. Bei Bestrahlung mit "Licht" werden Pyrimidin-Dimere monomerisiert. Nach ausreichender Belichtung wird der Enzymkomplex wieder abgespalten. Das Reaktionsschema läßt sich wie folgt wiedergeben (22, 16):



E = Photoreaktivierendes Enzym

S = Substrat = UV-Photo-produkte in der DNS

ES = Enzym-Substrat-Komplex

P = Reaktionsprodukt = reaktivierte DNS

Die Reaktionskinetik wurde 1962 von Rupert (32) untersucht.

3. Indirekte Photoreaktivierung

Jagger und Staffels (36) konnten 1966 zeigen, daß beim Stamm *E. coli* B phr⁻, der kein Photoreaktivierungsenzym besitzt, die letalen UV-Schaden unter geeigneten Bedingungen durch die Wirkung von langwelligem Licht ($\lambda = 334 \text{ nm}$) nach UV-Exposition vermindert werden können.

Zusammenfassende Darstellungen über die Photoreaktivierung sind 1955 von Dalbecq (29), 1956 von Jagger (37), 1964 von Rupert (38), 1966 von Setlow (23) und Rupert und Rayn (39) und 1970 von Bachmann (34) publiziert worden.

3. b. Dunkelreparatur:

Die Dunkelreaktivierung oder Dunkelreparatur unterscheidet sich von der Photoreaktivierung in folgenden Punkten (24):

1. Sie verläuft ohne Einwirkung von Licht
2. Sie erstreckt sich nicht nur auf die Eliminierung von inneren Zytolenen und UV-Schäden, sondern auch auf Schäden anderer Art, z.B. durch ionisierende Strahlung verursachte Läsionen sowie auf Vernetzungsschäden, die durch alkylierende Substanzen hervorgerufen

werden.

3. Dimere und Vernetzungen werden nicht gespalten, sondern in einem komplexen enzymatischen Prozeß herausgeschnitten und durch neu synthetisierte Abschnitte ersetzt. Es handelt sich demnach um einen universellen Reparaturprozeß, den man häufig auch als Excisionsreparatur bezeichnet.

Von Setlow und Carrier (39) sowie von Boyce und Howard-Flanders (23) wurde 1964 zum ersten Mal die Theorie eines enzymatischen Reparaturmechanismus für UV-geschädigte Bakterien-DNS aufgestellt. Diese Theorie konnte durch Experimente bewiesen werden und gilt heute als der wichtigste Reparaturprozeß für Schäden in der DNS, die durch UV-Licht und ionisierende Strahlung sowie durch mutagene Substanzen wie z.B. alkylierende Agenzien hervorgerufen werden (40).

Der direkte Nachweis der DNS-Reparatur wurde 1964 von Pettijohn und Hanawalt (41) erbracht. Unter Verwendung des Thymin-Antagonisten 5-Bromuracil, das sich durch ein größeres Molekulargewicht auszeichnet, konnten sie mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation zeigen, daß bei der Dunkelreparatur von UV-geschädigter DNS nur einzelne Abschnitte des DNS-Doppelstranges neu synthetisiert werden. Diese Abschnitte bestehen aus mindestens 25 Nucleotiden. Im Anschluß an eine vorangegangene Photoreaktivierung wird kein Bromuracil in die DNS eingebaut.

Von Howard-Flanders und Boyce (40) sowie von Howard-Flanders (42) wurden 1966 bzw. 1968 die wichtigsten Schritte fixiert, die an der DNS-Reparatur beteiligt sind (nach Hartmann, 24):

1. Einzelstränge der doppelsträngigen DNS werden unterbrochen durch
 - a. strahleninduzierte Kettenbrüche,
 - b. enzymatischen Herausschnitt geschädigter Basen,
 - c. ein Rekombinationsenzym, das in der frühen Phase der genetischen Rekombination in Aktion tritt.
2. Durch Enzymwirkung (Endonuclease) werden von den Bruchstellen her Nucleotide freigesetzt. In normalen Zellen scheinen diese Enzyme nur auf einer begrenzten Strecke wirksam zu sein.
3. Erweiterung der entstandenen Lücke durch eine 5' - 3'-Exonuclease, was sich in einem weiteren Abbau der DNS zeigt.
4. Die DNS-Helixstruktur wird durch eine DNS-Reparatur-Polymerase rekonstruiert, indem komplementäre Nucleotide von einem Ende des Einzelstranges her in die Lücken in 3' - 5' Richtung eingefügt werden. Das Ende des Einzelstranges dient dabei als Initiator, während der intakte DNS-Strang als Matritze dient.
5. Die Reparatur wird durch die Herstellung einer Phosphorsäurediesterbindung mit Hilfe einer Polynucleotid-Ligase vervollständigt, wenn das letzte Nucleotid in die Lücke eingefügt worden ist.

Die oben beschriebene Reparatur wird schematisch in Abb. 4 für die Eliminierung von dimerem Thymin wiedergegeben:

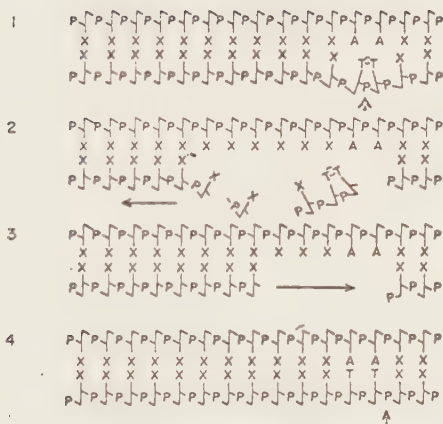


Abb. 4: Schematische Darstellung der Eliminierung von dimerem Thymin aus hochpolymerer DNS nach Howard-Flanders und Boyce (40).

1. DNS-Doppelstrang, der Thymin-Dimer enthält.
2. Das defekte Teilstück wird durch Endonucleasen angeschnitten und durch Exonucleasen herausgeschnitten.
3. Die entstandene Lücke wird durch Polymerase und Ligase geschlossen.
4. Wiederhergestellte normale DNS-Konfiguration.

Auf der Konferenz für Strahlen-Mikrobiologie 1965 in Chikago sind zwei Modelle der Dunkelreparatur von Boyce und Howard-Flanders (23), Setlow und Carrier (39) sowie

von Haynes (43) vorgeschlagen worden.

Sie sind als

1. "cut and patch" - Hypothese (Schneid- und Flick-Reparatur)
2. "patch and cut" - Hypothese (Flick- und Schneid-Reparatur)

bekannt geworden. Die "cut and patch"-Hypothese ist mit dem Schema auf Seite 17 identisch. Bei der "patch and cut"-Hypothese wird ein Reparatur-Komplex aus Nuclease und Polymerase postuliert, der die Bildung eines längeren Einzelstranges wie in Hypothese 1 umgeht. Nach dem Einschnitt der Endonuclease erfolgt die Reparatursynthese in einem Arbeitsgang, wobei der defekte Strang "zurückgeschält", abgeschnitten und weiter degradiert wird, während gleichzeitig ein neuer DNS-Strang synthetisiert wird. Die "patch and cut"-Reparatur gilt heute als wahrscheinlicher.

Durch die Dunkelreparatur werden, wie Hill (44) 1965 und Witkin (45) 1966 festgestellt haben, nicht nur Letalschäden, sondern auch lebensfähige Mutationen eliminiert.

Nachdem es 1966 Carrier und Setlow gelungen war, mit einem Extrakt aus *Micrococcus lysodeikticus* Thymin-Dimere aus isolierter DNS von *E. coli* zu eliminieren(46), gelang es Kaplan und Mitarbeitern (47) 1969, einen dem Photoreaktivierungsenzym aus Hefe bzw. *E. coli* entsprechenden Enzymkomplex aus *Micrococcus lysodeikticus* zu isolieren, der an der Excision von UV-induzierten Thymin-Dimeren beteiligt ist. Es handelt sich hierbei um eine Endonuclease, die nur in bestrahlter DNS Einzelstrangbrüche hervorruft, und um eine Exonuclease, die bestrahlte oder denaturierte DNS hydrolysiert. Die kombinierte Wirkung beider Enzyme führt zur quantitativen Entfernung von Photoprodukten, aus UV-bestrahlter DNS. Zur Eliminierung eines TT werden

etwa 5 Nucleotide pro Einzelstrang herausgeschält.

Daß es sich bei der Photoreaktivierung und bei der Dunkelreparatur um unterschiedliche Mechanismen handelt, konnten Kneser, Metzger und Sauerbier (48) zeigen. Sie wiesen nach, daß die Photoreaktivierung im Gegensatz zur Dunkelreparatur auch in Gegenwart von Coffein ablief.

Eine Zusammenfassende Darstellung über die Dunkelreparatur ist 1970 von Hartmann (24) veröffentlicht worden.

4. Schädigung und Reparatur nach Röntgenbestrahlung

a. Angriffspunkt der ionisierenden Strahlung in der Zelle:

Die Kenntnisse von den molekularen Mechanismen, die nach Röntgenbestrahlung zum Zelltod führen, sind geringer als bei der UV-Strahlenwirkung. Die Ursache liegt darin, daß die UV-Strahlenwirkung seit längerer Zeit untersucht wird und daß sie auf molekularer Ebene spezifischer und durch das Auftreten der Pyrimidin-Photoprodukte leichter zu erfassen ist, als die zufällige Ionisation, die durch Röntgenstrahlung im Molekül hervorgerufen wird. Ionisierende Strahlung greift im Gegensatz zu ultraviolettem Licht die einzelnen Moleküle wahllos an.

Ein Angriffspunkt ionisierender Strahlung kann durch Veränderungen der Strahlenempfindlichkeit im biologischen System aufgedeckt werden: Bakterien, die in Gegenwart von Pyrimidin-Analogen wachsen, ohne daß ein Einbau der Basen in die DNS erfolgen kann, zeigen eine unveränderte Strahlenempfindlichkeit. Der Einbau von Basenanalogen (z.B. 5-BU) in die DNS führt zu einer erheblichen Steigerung der Strahlenempfindlichkeit (49). Hieraus wurde gefolgert, daß die DNS auch beim Zelltod durch ionisierende Strahlung den Hauptangriffspunkt darstellt. Einen weite-

ren Hinweis, daß der Strahlenschaden innerhalb des DNS-Moleküls erfolgt, brachten Untersuchungen an transformierten Bakterien-DNS, die entweder in vitro (nach Extraktion) oder in vivo (in der Bakterienzelle) bestrahlt werden kann. Der Einbau von 5-BU führt sowohl zu einer wesentlichen Steigerung der Röntgen- als auch der UV-Strahlenempfindlichkeit (49).

Der Einbau der halogenierten Basenanaloga ist möglich, da die van der Waal'schen Radien der Chlor-, Brom- und Jod-Gruppen dem der Methylgruppe des Thymins ähnlich sind.

Insbesondere die Brom- und Jod-substituierten Basenanaloga werden durch ultraviolette Licht stärker angegriffen als Thymin, was in der DNS zu möglicherweise nicht reparierbaren Photoprodukten führt. Ferner treten in BU- und JU-substituierter DNS verstärkt Einzel- und Doppelstrangbrüche (s.u.) auf. Dies wird auf sekundäre Radikalreaktionen des BU und JU zurückgeführt, die zur Zerstörung der Desoxyribose führen (27).

Die Sensibilitätssteigerung von BU- und JU-substituierter DNS gegenüber ionisierender Strahlung wird von Hüttermann und Müller (50) vornehmlich auf ein COH-Radikal zurückgeführt, das durch Anlagerung von Wasserstoff an die C₍₄₎-Carbonylgruppe des Uracils entsteht. Dadurch wird die normalerweise in der DNS von dieser Position ausgehende Wasserstoffbindung zerstört, wodurch sich möglicherweise eine lokale Denaturierungszone ausbildet (27). Durch Smith und Hanawalt (12) wird außer der strahlenchemischen Sensibilisierung eine Hemmung des Ablaufs der enzymatischen Reparaturprozesse (Photoreaktivierung und

Dunkelreparatur) durch die Basenanaloga diskutiert.

Der Einbau von Basenanalogen ist nicht unbedingt notwendig, um auf dem Wege des Vergleichs den Beweis der strahlenbiologischen Bedeutung der DNS zu erbringen, da die natürlichen Basen selbst Analoge mit unterschiedlicher Strahlenempfindlichkeit darstellen. So ist Thymin ein Analogon zum Cytosin (C) und Adenin das Analoge des Guanins (G). Es gibt mehrere Arten von Bakterien, deren DNS sich im Gehalt von Adenin und Thymin im Verhältnis zu Guanin und Cytosin unterscheidet (z.B. *Pseudomonas aeruginosa* mit 67 % GC, *E. coli* mit 50 % G C, *Bacillus cereus* 35 % G C). Untersuchungen der Röntgenstrahlenempfindlichkeit dieser Bakterienarten zeigten einen deutlichen Zusammenhang zwischen Strahlenempfindlichkeit und dem Gehalt an Guanin und Cytosin in der DNS, der auf eine lineare Zunahme der Empfindlichkeit mit steigendem Guanin-Cytosin-Gehalt hinweist (52). Untersuchungen mit ultravioletem Licht ergaben ein genau umgekehrtes Verhältnis von Strahlenempfindlichkeit und Basengehalt, was unseren Kenntnissen von der Bedeutung der Thymin-Dimeren bei der UV-Inaktivierung der DNS entspricht (12).

b. Erläuterungen zur Wirkung ionisierender Strahlung

Der Nachweis, daß die DNS den Hauptangriffspunkt ionisierender Strahlung darstellt, erklärt noch nicht den Wirkungsmechanismus ionisierender Strahlung, so daß die folgenden Erläuterungen für notwendig erachtet werden.

1. Entwicklung eines Strahlenschadens:

Nach Platzmann (54) läßt sich die Entwicklung eines

Strahlenschadens in vier zeitliche Abschnitte unterteilen:

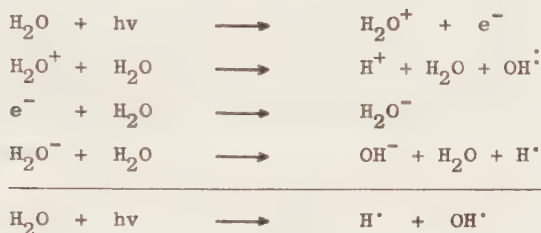
- a. Physikalische Phase, Dauer 10^{-13} sec.
Durch Energieübertragung an Materie entstehen angeregte oder ionisierte Moleküle.
- b. Physiko-chemische Phase, Dauer 10^{-10} sec.
Die Primärprodukte aus a. erzeugen spontan oder bei Zusammenstößen mit Molekülen der Umgebung freie Atome oder Radikale.
- c. Chemische Phase, Dauer 10^{-6} sec.
Nach Erreichen eines chemischen Gleichgewichts treten die Produkte aus b in die Phase c ein. Dabei reagieren die aktivierten Moleküle untereinander oder mit ihrer Umgebung.
- d. Biologische Phase, Dauer bis zu mehreren Jahren.
Molekulare Veränderungen im biologischen Objekt können dieses System stören oder verändern, wobei sich die schließlich zu beobachtende biologische Wirkung ausbildet.

Beginnt diese Ereigniskette in dem zu untersuchenden Objekt, z.B. in der DNS, so spricht man von direkter Strahlenwirkung oder dem direkten Effekt (27). Hierbei wird das getroffene Molekül durch ein Photon, ein Elektron oder ein anderes atomares Teilchen ionisiert oder angeregt. Wird die Strahlung dagegen primär in der Umgebung des betrachteten Biomoleküls absorbiert und durch intermolekulare Energieleitung oder durch Radikale übertragen, so spricht man von indirekter Strahlenwirkung (27).

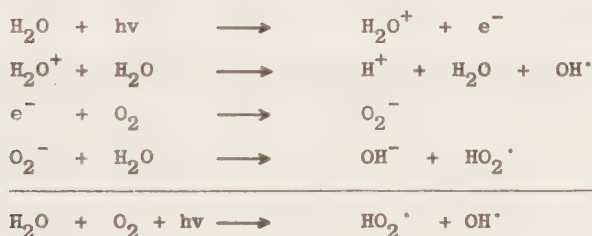
2. Strahlenchemie des Wassers

Da Wasser am häufigsten in biologischen Systemen vorkommt, spielt es eine Rolle bei der Inaktivierung gelöster Moleküle, die durch das folgende Reaktions-

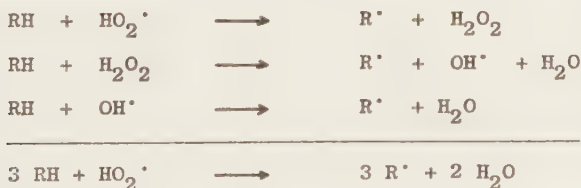
schema dargestellt wird (nach Smith und Hanawalt (12)):



In Anwesenheit von Sauerstoff kann es zu folgenden Reaktionsabläufen kommen:

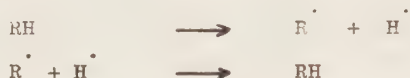


Hieraus folgt, daß die reduzierenden Eigenschaften von $\text{H}^\cdot$ bei Anwesenheit von Sauerstoff in oxidierende Reaktionsprodukte umgewandelt werden, wobei $\text{HO}_2^\cdot$ in seiner oxidierenden Wirkung drei $\text{OH}^\cdot$ -Radikalen entspricht:

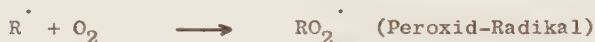


Dies erklärt, weshalb Zellen in Gegenwart von Sauerstoff etwa dreimal strahlenempfindlicher sind als in sauerstofffreiem Milieu.

In Abwesenheit von Sauerstoff ist eine Wiederherstellung des ionisierten Moleküls durch Vereinigung der Radikale möglich, in Gegenwart von Sauerstoff dagegen nicht (12):



dagegen



3. Strahlenprodukte der Purine und Pyrimidine

Wie gegen UV-Strahlung sind die Pyrimidine auch gegenüber ionisierender Strahlung empfindlicher als die Purine (12). Eine Übersicht einiger G-Werte⁺ von Purinen und Pyrimidinen ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1: G-Werte für DNS-Basen (nach Smith und Hanawalt, 12)

	einzelne Desoxyribonucleotide	DNS
Thymin	1,65	0,33
Adenin	0,76	0,25
Summe	2,41	0,58
Cytosin	2,00	0,23
Guanin	0,78	0,18
Summe	2,78	0,41

⁺) Unter dem G-Wert versteht man die Anzahl von Molekülen, die durch die Absorption der Energie von 100 Elektronenvolt verändert werden.

In Gegenwart von Sauerstoff werden die Purine vornehmlich unter Zerstörung des Imidazolringes aufgespalten, wobei z.B. aus Adenin 5,6-Diamino-4-formamidopyrimidin entsteht (55, 56). Weiterhin sind Desaminierung des Adenins (zu Hypoxanthin) (55,56) und N-Oxidbildung (z.B. zu Adenin-1-N-Oxid (56) nachgewiesen worden.

Pyrimidine werden durch ionisierende Strahlung hauptsächlich an der 5-6-Doppelbindung durch $H^{\bullet}$ -, $OH^{\bullet}$ - und $HO_2^{\bullet}$ -Radikale angegriffen, was zu einer Anzahl von Bestrahlungsprodukten führt. Als Bestrahlungsprodukte des Uracils sollen hier 6-Hydroxy-5-hydroperoxyuracil, 5,6-Dihydrouracil, Isobarbitursäure, Barbitursäure und 6-Hydroxy-5-hydrouracil (12) und als Bestrahlungsprodukte des Thymins 5-6-Dihydrothymin, 5-Hydroxy-5,6-dihydrothymin, 5-Hydroxy-5-methylbarbitursäure und 5-Methyl-5-hydroxyhydantoin (57) genannt werden. Von Interesse sind in diesem Zusammenhang Arbeiten von Schmidt und Mitarbeitern (58,59), Lochmann (60) und Hartmann (61), die berichteten, daß ihnen die Spaltung dimeren Thymins und dimeren Uracils mit 34 MeV-Elektronen gelungen war. Greulich (62) berichtete 1968 über die Spaltung von dimerem Thymin in der DNS von E. coli Bs-1, wobei durch Verabreichung von 100 krad 34 MeV-Elektronen etwa 15 % der UV-induzierten Thymin-Dimeren wieder monomerisiert werden konnten.

4. Chemische Veränderungen in der DNS

Die Hauptwirkungen, die durch ionisierende Strahlung in der DNS hervorgerufen werden, sind Unterbrechungen von Wasserstoffbrücken, Abbau von Basen und Kettenbrüche. Bei den Kettenbrüchen handelt es sich um Aufspaltungen der Phosphorsäureesterbindungen, wobei

zwischen subletalen Einzelstrang- und letalen Doppelstrangbrüchen unterschieden wird.

Einzel- und Doppelstrangbrüche werden sowohl durch direkte Treffer als auch durch indirekte Effekte (Radikale $R_1^\bullet$) hervorgerufen, während Basenschäden hauptsächlich durch indirekte Sauerstoff-abhängige Effekte (Radikale $R_2^\bullet$) verursacht werden (Abb.5).

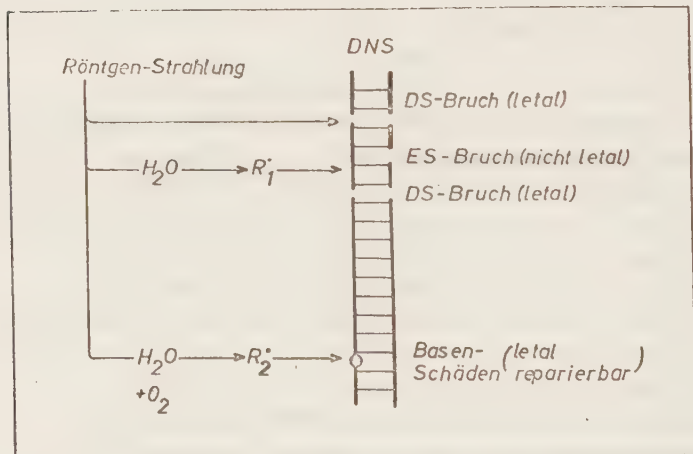


Abb. 5: Schematische Darstellung von Röntgenstrahlenschäden nach Szybalski (53.)

DS-Bruch = Doppelstrangbruch (letal)

ES-Bruch = Einzelstrangbruch (nicht-letal)

c. Reparatur von Röntgenstrahlenschäden in Bakterien

Von den aufgezeigten Schäden durch ionisierende Strahlung stellen Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNS die biologisch bedeutsamsten Läsionen dar, deren Erfassung mit chemisch-physikalischen Methoden möglich ist.

So konnten McGrath et al. (63,64) mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation nachweisen, daß zwischen Zellüberleben und der Eliminierung von Einzelstrangbrüchen ein enger Zusammenhang besteht.

Untersuchungen, bei denen Bakterien gleichzeitig mit UV- und Röntgenstrahlen bestrahlt wurden, haben gezeigt, daß bei der Eliminierung von UV- und Röntgenstrahlenschäden einige Reaktionsschritte identisch sind (65). Einige Tatsachen sprechen jedoch dafür, daß es sich bei der Reparatur von UV-Schäden um einen "aufwendigeren" Prozeß handelt als bei der Reparatur von Röntgenstrahlenschäden: Es gibt viele UV-sensitive Mutanten, die in der Lage sind, röntgenstrahlen-induzierte Einzelstrangbrüche zu reparieren, während bislang nur eine Mutante von *E. coli* isoliert worden ist, die gegenüber ionisierender Strahlung eine höhere Sensitivität aufweist als gegenüber UV-Strahlen (66). Hieraus kann geschlossen werden, daß der Reparaturmechanismus für Röntgenstrahlenschäden dem der Dunkelreparatur von UV-Schäden ähnlich ist, aber zumindest in einem Schritt vom Weg der Dunkelreparatur abweicht. Dies kommt auch in den hohen Röntgendosen zum Ausdruck, die zur völligen Inaktivierung von Bakterien benötigt werden (63).

Eine Reparatur von Doppelstrangbrüchen konnte bisher nur bei *Micrococcus radiodurans* nachgewiesen werden (67).

Als Schritte einer Reparatur von Röntgenschäden konnten der Abbau und eine anschließende Neusynthese der DNS nachgewiesen werden, die mit der Vereinigung gebrochener Einzelstränge einhergehen.

Der Abbau der Bakterien-DNS kommt in der Freisetzung von DNS-Bruchstücken zum Ausdruck und findet innerhalb der ersten beiden Stunden nach der Bestrahlung statt. Der DNS-Abbau kann als erster Schritt bei der Eliminierung von Strahlenschäden angesehen werden (68-71). Hierbei werden bis zu 50 % der DNS abgebaut. Es konnte nachgewiesen werden, daß der Abbau das gesamte DNS-Molekül betrifft und nicht auf einen Strang begrenzt ist (72). Schematisch entspricht die Reparatur von Röntgenschäden der auf Seite 18 wiedergegebenen Schneid- und Flick- bzw. Flick- und Schneid-Reparatur.

II. Erläuterungen zur Strahlenwirkung auf Säugetierzellen

1. Schädigung und Reparatur nach UV-Strahlung

Die Übertragung der strahlenbiologischen Versuche mit Bakterien auf Säugetierzellsysteme und in der Folgezeit auch auf Pflanzenzellsysteme (21,73-75) begann etwa 1960 und führte 1964 zum Nachweis einer Reparatur von UV-induzierten Schäden in HeLa- und chinesischen Hamsterzellen durch Rasmussen und Painter (76). Die Arbeitsgruppe zeigte, daß 99 % aller HeLa-Zellen nach

UV-Bestrahlung markiertes Thymidin einbauten, während dies in unbestrahlten Zellen nur zu 53 % der Fall war. Gleichzeitig wiesen sie nach, daß die verschiedenen Säugetierzellen auf UV-Strahlung unterschiedlich reagieren: In Zellen des chinesischen Hamsters nahm die Fraktion der Zellen, die Thymidin einbaute nur zu, wenn die Zellen vor der Bestrahlung in 5-BUDR-haltigem Medium inkubiert wurden, während dies bei HeLa-Zellen sowohl nach Inkubation in Thymidin- als auch 5-BUDR-haltigem Medium der Fall war.

Daß 99 % aller HeLa-Zellen nach UV-Bestrahlung Thymidin einbauten, zeigt, daß es sich um einen von der normalen DNS-Synthese unabhängigen Prozeß handelt, der als Reparaturprozeß gedeutet werden kann.

1.a. Inhibitoren zur Aufdeckung von Dunkelreparaturprozessen

Bei den folgenden Untersuchungen verschiedener Zellkulturen führte die Anwendung von Inhibitoren zum Nachweis von Dunkelreparaturprozessen in mehreren Zellreihen (77-80).

Die zur Aufdeckung von Reparaturprozessen verwendeten Inhibitoren lassen sich folgenden vier Gruppe zuordnen:

1. Mitosegifte:

Die Verbindungen dieser Gruppe greifen in den Teilungszyklus der Zellen ein. Hierher gehören Colchicin und seine Derivate sowie Vinblastin, Vincristin und einige Derivate.

2. Ruhekerngifte:

Zu dieser Gruppe gehören alkylierende Verbindungen, die die DNS während des gesamten Zyklus an-

greifen und hauptsächlich Vernetzungsschäden und Strangbrüche verursachen.

Die Verbindungen dieser Gruppe wirken in ähnlicher Weise wie Röntgenstrahlen.

Als Modellverbindungen dieser Gruppe eignen sich besonders Lost und Stickstofflost (81), Methylmethansulfonat (82, 83), N-methyl-N-nitrosoharnstoff und N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (84).

Der Angriff dieser alkylierenden Substanzen auf die DNS erfolgt vornehmlich an den Guanin- und in geringerem Ausmaß an den Adenin-Molekülen unter Bildung von N-7-Alkylguaninen und N-3-Alkyladeninen. Die Nitroso-Verbindungen bilden außerdem O-6-Methylguanine (84).

3. Antimetabolite und cytotoxische Substanzen:

In diese Gruppe gehören

- a. DNS-Synthesehemmer, die in die Reaktionswege der Nucleosid-Triphosphatsynthese eingreifen, wie z.B. Oxyharnstoff (85) und die bereits erwähnten Basenanalogen (s. S. 20). Oxyharnstoff hemmt die DNS-Synthese wahrscheinlich durch die Hemmung von Ribonucleosid-Diphosphat-Reduktase (86-88). Diese Hemmung führt wiederum zu einem Mangel an Desoxynucleotid-Vorstufen. HeLa-Zellen werden in ihrer Lebensfähigkeit erst angegriffen, wenn die Inkubation mit Oxyharnstoff während einer Generationszeit oder länger erfolgt (89,90). Chinesische Hamsterzellen dagegen werden nach kurzer Zeit abgetötet, wenn die Inkubation mit Oxyharnstoff während der DNS-Synthese-Phase (S-Phase) er-

folgt (31). In H. Kp. 2 - Zellen konnten Gayle und Strauss (32) nachweisen, daß unter dem Einfluß von Oxyharnstoff die DNA-Syntheserate stark abfällt und die gebildete DNA ein etwas kleineres Molekulargewicht aufweist. Dieser Befund spricht für die Annahme, daß der Zellverlust nach Einwirkung von Oxyharnstoff durch ein gestörtes Wachstum erfolgt. Als weiteren nicht regenerierbaren letalen Schaden nach 24 - 48 Stunden Einwirkung von Oxyharnstoff konnten Gayle und Strauss (32) das Auftreten von Doppelstrangbrüchen in der DNA von H. Kp. 2 - Zellen nachweisen.

Die halogenierten Pyrimidine 5-Fluor-, 5-Chlor-, 5-Brom- und 5-Joduracil sowie 5-Aminouracil wirken als Antagonisten des Thymins. In Säugerzellen finden hauptsächlich die Nukleotide der Pyrimidinsynthese Verwendung, da sie schneller abgebaut werden.

3. Substanzen, die mit der DNA Verbindungen eingehen:

Ariflavine (34), Kristallviolett (35), Actinomycin D (36) und Mitomycin C (37, 38).

4. Substanzen mit unklarem Angriffsweg und un-eindeutlichem Wirkungsspektrum, wie z.B. Coffein, das einen Reizhemmer darstellt (39, 40) und Cytosinindol (41), das sowohl in die DNA- als auch in die Proteinbiosynthese eingreift.

1. b. Erfassung der Überlebensrate

Bei Untersuchungen der Kolonieformfähigkeit UV-bestrahlter Zellen konnten Reparaturmechanismen erst nach Anwendung von Inhibitoren nachgewiesen werden. So zeigte Rauth (77) 1967, daß nach UV-Bestrahlung durch anschließende Inkubation in Coffein-haltigem Medium die Kolonieformfähigkeit von Maus-L-Zellen herabgesetzt wurde. In unbestrahlten Zellen war dies in geringerem Maße bzw. überhaupt nicht der Fall. Die erzielten Ergebnisse entsprachen in mehreren Punkten den Ergebnissen bei zur Dunkelreparatur befähigten Bakterien. Die Wirkung des Coffeins ist konzentrationsabhängig und unmittelbar auf die Zeit nach der Bestrahlung beschränkt. Maus-L-Zellen, die für einen Generationszyklus nach der Bestrahlung in Coffein-freiem Medium inkubiert wurden, zeigen bei anschließender Inkubation in Coffein-haltigem Medium keine weitere Abnahme der Kolonieformfähigkeit. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich die individuelle Reaktion verschiedener Zellkulturen auf unterschiedliche Inhibitoren:

Arlett (102) zeigte 1967 in Kenntnis der Arbeit von Rauth (77) an zwei Zellreihen des chinesischen Hamsters, daß nach Zugabe von Coffein, Theophyllin, Acriflavin, Chloramphenicol, Cycloheximid, Aktinomycin D oder Oxyharnstoff keine Veränderung der Überlebensfähigkeit nach UV-Bestrahlung der Zellen eintrat. Da in den Zellen des chinesischen Hamsters auch kein biochemischer Dunkelreparaturprozeß nachzuweisen war (103), wurde vermutet, daß UV-induzierte teilweise letale Schäden nicht repariert wurden. Diese Annahme wird durch eine Arbeit von Humphrey et al. (1970) (104) bestätigt, der bei der Untersuchung anderer Zellreihen des chinesischen Hamsters in einer Reihe einen Reparaturmechanismus nachweisen konnte, während sich eine weitere Zellreihe als nicht reparaturfähig erwies.

Bei weitergehenden Untersuchungen konnten Domon und Rauth (78, 105) 1969 zeigen, daß Coffein bei UV-bestrahlten Maus-L-Zellen in der frühen S-Phase wirkt. Bei Bestrahlung in der G_1 - und in der G_2 -Phase bewirkte Coffein nur eine geringe Verzögerung des Übergangs der Zellen von G_1 zur S-Phase und von G_2 zur Mitose. Geringe UV-Dosen (100 Erg/mm^2) in der frühen S-Phase führten dagegen in Gegenwart von Coffein zu einem spezifischen Block beim Durchlaufen der DNS-Synthese-Phase (**S-Phase**).

Diese UV-Empfindlichkeit zu Beginn der S-Phase wurde ebenfalls von Sinclair und Morton (106) in Zellen des chinesischen Hamsters gefunden. Humphrey et. al. (188) haben gezeigt, daß Zellen des chinesischen Hamsters in der S-Phase stärker geschädigt werden als in der G_1 - und der G_2 -Phase. In einer weiteren Arbeit wiesen Steward und Humphrey (111) nach, daß diese Schädigung der Zellen in der S-Phase mit einer stärkeren Induktion von Pyrimidin-Dimeren durch UV-Strahlung einhergeht. Sie konnten nicht klären, ob die verstärkte Zunahme der Pyrimidin-Dimeren in der S-Phase nach UV-Bestrahlung auf einer physikalischen Veränderung der DNS beruht, oder ob die Zellen während des übrigen Zellzyklus zur Eliminierung und somit zur Reparatur dieser UV-Schäden in der Lage waren.

Die spezifische UV-Empfindlichkeit zu Beginn oder in der Mitte der S-Phase wurde in allen bisher untersuchten Zellreihen gefunden (105 - 112).

1. c. Reparatur-Replikation und außerplanmäßige DNS-Synthese

Die Übereinstimmung der Reparaturprozesse in Zellkulturen mit der Dunkelreparatur in Bakterien wurde in

gewissem Umfang auch bei der biochemischen Erfassung der Strahlenschäden und ihrer Reparaturmechanismen gefunden.

Hierbei war die bereits erwähnte Arbeit von Rasmussen und Painter (76), in der über einen verstärkten nicht-semikonservativen Einbau (s.u.) von Tritium-markierten Thymidin nach UV-Bestrahlung berichtet wurde, lange Zeit richtungsweisend.

So fand Cleaver 1965 (114,115) bei der Untersuchung der UV-Strahlenabhängigkeit der DNS-Synthese in Maus-L-Zellen und menschlichen Amnionzellen (FL-Zellen) eine eindeutige Hemmung der DNS-Synthese. Gleichzeitig stellte Cleaver eine Reparatur fest, die nur bei geringen UV-Dosen eintrat: Bei einer applizierten Dosis von 240 Erg/mm^2 kam es zu einer Abnahme der DNS-Synthese, die nach zwei Stunden ein Minimum erreichte, um dann wieder anzusteigen. Bei einer Dosis von 900 Erg/mm^2 sank die DNS-Synthese innerhalb von 3 Stunden auf ein Minimum ohne anschließend wieder anzusteigen.

In einer weiteren Arbeit mit Maus-L-Zellen und FL-Zellen konnte Cleaver (116) 1967 zeigen, daß in der menschlichen FL-Zellreihe im Gegensatz zu den Maus-L-Zellen nach UV-Bestrahlung und anschließender Inkubation in $^3\text{H-TdR}$ -haltigem Medium die Fraktion der Zellen zunahm, in die markiertes Thymidin eingebaut wurde. Cleaver wirft in dieser Arbeit die Frage auf, ob es sich bei dem strahleninduzierten Einbau von Thymidin um einen Reparaturprozeß (Repair-replication) oder um eine außerplanmäßige DNS-Synthese (unscheduled DNA synthesis) handelt.

Der Begriff der Reparatur-Replikation wurde von Pettijohn und Hanawalt (41) für einen Reparatur-prozeß in Bakterien formuliert und beschreibt eine nichtsemikonservative DNS-Synthese, die nach Schä-digung der DNS erfolgt und nach Excision geschädigter Nucleotide den Einbau neuer Bausteine in die bereits vorhandenen DNS-Stränge umfaßt. Hierbei dient der nichtgeschädigte DNS-Strang als Matritze. Schema-tisch ist die Reparatur-Replikation in Abbildung 6 wiedergegeben.

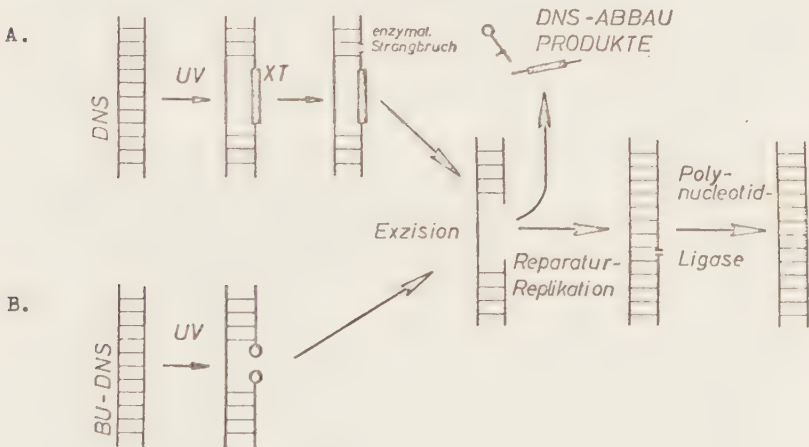


Abb. 6: Reaktionsschema der Reparatur strahlenin-duzierter Basenschäden und Einzelstrang-brüche. Es sollen nur die zur Reparatur not-wendigen Schritte, nicht jedoch alle bioche-mischen Reaktionen aufgezeigt werden.

A. Basenschäden durch UV in normaler DNS

B. Strangbrüche in 5-BU substituiertem DNS
(nach Cleaver (117))

Der Nachweis der Reparatur-Replikation ist mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung von ^3H - oder ^{14}C -5-BUdR und 5-JUdR als DNS-Bausteinen möglich. Vollständig neu synthetisierte DNS weist in dieser Versuchsanordnung durch den Einbau der halogenierten Basenanaloga mit höherem Molekulargewicht in den neu gebildeten DNS-Strang ein anderes Sedimentationsprofil auf als DNS, in der eine teilweise Reparatur-Replikation stattgefunden hat. Diese DNS ist zwar radioaktiv markiert, wird in ihrem Sedimentationsprofil jedoch kaum verändert.

Unter "außerplanmäßiger DNS-Synthese" versteht man jeden DNS-Synthesevorgang außerhalb der S-Phase (DNS-Synthese-Phase) (Cleaver, (117)).

Der Nachweis der "außerplanmäßigen DNS-Synthese" kann mit Hilfe der Autoradiographie und durch Erfassung der Einbaurates in Zellen erfolgen, in denen die normale DNS-Synthese gehemmt ist. Bei autoradiographischen Untersuchungen erscheinen Zellen in der S-Phase stärker markiert als Zellen, die außerhalb der DNS-Synthesephase DNS-Vorstufen eingebaut haben. Arbeiten von Painter und Cleaver (80, 113, 117-119) und Smets (120) weisen darauf hin, daß vermutlich jede Form der strahleninduzierten DNS-Synthese im Einbau von DNS-Vorstufen in bereits ausgebildete DNS-Stränge erfolgt, so daß wahrscheinlich mit verschiedenen Methoden der gleiche Prozeß nachgewiesen wird. Hierfür spricht insbesondere, daß weder Reparatur-Replikation noch "außerplanmäßige DNS-Synthese" durch Oxyharnstoff gehemmt werden, während die semikonservative DNS-Synthese fast völlig zum Erliegen kommt (88, 90, 79, 156).

1. d. Excision von Pyrimidin-Dimeren

Neben der Untersuchung der Reparatur-Replikation erwies sich wie in Bakterien die Suche nach UV-induzierten Photoprodukten als aufschlußreich.

1965 konnte Klimek (121) nachweisen, daß in Maus-L-Zellen nach UV-Bestrahlung Pyrimidin-Dimere gebildet werden und daß die gebildeten Dimeren linear mit der applizierten Dosis zunehmen. Eine ~~Excision~~ der Dimeren nach längerer Inkubation im Anschluß an die Bestrahlung konnte Klimek nicht finden, obwohl die DNS-Synthese in den L-Zellen durch die gebildeten Dimeren nicht zum Erliegen kam (122,123).

Trosko und Mitarbeiter (103, 124) konnten in Zellen des chinesischen Hamsters ebenfalls die Induktion von Thymin-Dimeren nachweisen, eine Excision oder Spaltung der Dimeren fand jedoch nicht statt.

Regan et al. (125) wiesen in den menschlichen Zellreihen RA (recovered amnion), RA X 10 (durch Röntgenstrahlen mutierte RA-Zellen), HeLa und WI-38 nach, daß annähernd 50 % des induzierten dimeren Thymins bei anschließender Inkubation wieder eliminiert wurden. Dieser Eliminierungsprozeß wurde weder durch Coffein noch durch überschüssiges Thymidin oder Oxyharnstoff beeinflusst. Horikawa und Mitarbeitern (126) gelang es bei der vergleichenden Untersuchung fibroblastischer Maus-L-Zellen, von Schweinenieren-(PS)-Zellen und Maus-Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellen in den Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellen eine Abnahme der induzierten Dimeren um 30 % innerhalb der ersten 24 Stunden nachzuweisen. Die beiden anderen Zellreihen zeigten keine Abnahme der induzierten Dimeren. In Maus-Ehrlich-Ascites-

Tumor-Zellen fand die Excision der Dimeren nur innerhalb der ersten 24 Stunden statt. Obwohl nur ein Teil der Dimeren eliminiert wurde, ist dieser Vorgang als Reparaturprozeß anzusehen, da die Maus-Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellen gegenüber den beiden anderen Zellreihen eine wesentlich geringere Hemmung der Koloniefähigkeit nach UV-Bestrahlung aufwiesen.

Einen weiteren Beweis dafür, daß es sich bei der Excision des dimeren Thymins um einen Reparaturprozeß handelt, konnten Setlow und Mitarbeiter (127) erbringen, indem sie nachwiesen, daß aus gesunden diploiden Hautfibroblasten (Mensch) bis zu 70 % der induzierten Pyrimidin-Dimeren eliminiert wurden, während entsprechende Fibroblasten, die von einem Patienten mit Xeroderma pigmentosum⁺⁾ gewonnen wurden, weniger als 20 % der Dimeren eliminierten. Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation konnten sie zeigen, daß in den ersten 24 Stunden nach der UV-Bestrahlung eine große Zahl von Einzelstrangbrüchen auftraten und wieder geschlossen wurden, was bei Xeroderma-pigmentosum-Zellen nicht der Fall war.

Cleaver (117) konnte zeigen, daß Xeroderma-pigmentosum-Zellen (XP) geschädigte Bausteine aus UV-bestrahlter DNS eliminieren können, wenn die reaktionsauslösenden Einzelstrangbrüche künstlich mit nicht-enzymatischen Methoden erzeugt werden. Sie wiesen nach, daß UV-be-

⁺⁾ Xeroderma pigmentosum ist eine rezessiv vererbte Krankheit, die sich in starker Empfindlichkeit gegenüber ultraviolettem Licht äußert. Bereits in den ersten Lebensjahren kommt es auf belichteten Hautstellen durch Sonnenbestrahlung zu Pigmentflecken, aus denen sich warzenartige Gebilde und Karzinome entwickeln.

strahlte XP-Zellen nach UV-Bestrahlung nicht zur Reparatur-Replikation befähigt sind, während in 5-BU-substituierten Zellen oder nach Röntgenbestrahlung eine Reparatur-Replikation stattfand. Da UV-Strahlung in 5-BU-substituierter DNS durch Basenschädigung zu Einzelstrangbrüchen führt (siehe S.20), kann geschlossen werden, daß für die Excision von Pyrimidin-Dimeren aus UV-bestrahlter DNS in Säugetierzellen ebenso wie in Bakterien zwei Enzyme benötigt werden: eine Endonuclease, die die UV-bestrahlte DNS angreift und die Ausbildung von Einzelstrangbrüchen in der Nähe der Basenschäden katalysiert, und eine Exonuclease, die die Strangunterbrechungen angreift und die Pyrimidin-Dimeren aus der DNS freisetzt (46,47).

Im Falle von Xeroderma pigmentosum bedeutet dies, daß die Exonucleasewirkung in den Zellen vorhanden ist, während die Endonucleasewirkung fehlt.

Den direkten Nachweis von zwei DNS-spezifischen Exonucleasen in Säugetierzellen konnte Lindahl (128) 1971 erbringen, der aus Kaninchenleber-Nuclei bzw. aus Kaninchenlunge die Desoxyribonucleasen III und IV isolierte. DNase III zeigte nur eine schwache Wirkung bei der Freisetzung von Pyrimidin-Dimeren. DNase IV dagegen erwies sich bei in vitro-Versuchen als sehr wirksam bei der Freisetzung von Pyrimidin-Dimeren. Die Excision erfolgte aus Polydesoxynucleotiden und aus isolierter DNS in Form von Dimeren-haltigen Oligonucleotiden. Bei keiner der beiden Exonucleasen konnte eine Hemmwirkung durch Coffein festgestellt werden.

Während nach den vorliegenden Ergebnissen ein Dunkelreparatur-ähnlicher Prozeß in menschlichen Zellen als wahrscheinlich anzunehmen ist, gelang bisher der Nach-

weis einer Photoreaktivierung nicht. Trosko und Isoun (129) berichten, daß in menschlichen Amnion-Zellen (AV_3) und in HeLa-Zellen nach UV-Bestrahlung und anschließender Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge $3650 \text{ \AA}$ weder die UV-abhängige Hemmung der DNS-Synthese aufgehoben wird, noch daß es zu einer verstärkten Ex-cision von Dimeren kommt. Die zusätzliche Strahlung bewirkte selbst eine Hemmung der DNS-Synthese.

In AV_3 -Zellen konnten nach Applikation von Sonnenlicht Thymin-Dimere nachgewiesen werden, nicht aber eine Photoreaktivierung. In einer weiteren Versuchsanordnung wurden AV_3 -Zellen im Labor mit ultravioletem Licht bestrahlt und anschließend einer Sonneneinstrahlung ausgesetzt, aus der die UV-Strahlung mit einer Glasscheibe herausgefiltert wurde. Unter diesen Bedingungen konnte keine Abnahme und somit auch keine Monomerisierung der induzierten Dimeren festgestellt werden (130). Trosko und Mitarbeiter (103) konnten ferner in Zellen des chinesischen Hamsters, Cleaver in menschlichen Hautzellen (131) sowie Cook und McGrath (132) in Zellen der Maus, der Ratte, des Kaninchens und des Kalbes keine Photoreaktivierung nachweisen.

Die hier angeführten Arbeiten, die eine Photoreaktivierung in einer großen Zahl von Zellen ausschließen, stehen in Widerspruch zu einer Arbeit von Roth (133), der 1968 mit Hilfe einer Farbbindungsreaktion zwischen Acriflavin und dem Thymin der DNS eine Photoreaktivierung nachzuweisen versuchte. Da dimeres Thymin keine Farbbindungsreaktion mit Acriflavin eingeht, wurde die Farbtintensität vor und nach UV-Bestrahlung gemessen. Nach UV-Bestrahlung und anschließender Bestrahlung mit sichtbarem Licht erfolgte eine größere Farbbindungsreaktion als unmittelbar nach der UV-Bestrahlung. Die Farbbindung fand einheitlich in Maus-3T3-

Zellen, in HeLa S₃-Zellen, diploiden menschlichen WI-38-Zellen und menschlichen Buccalzellen statt. Da eine erfolgte Photoreaktivierung den bisherigen Untersuchungen dieser und ähnlicher Zellreihen widerspricht, folgern Trosko und Isoun (129), daß durch die Bestrahlung mit langwelligem Licht (3650 Å) ein von der Photoreaktivierung unabhängiger Prozeß hervorgerufen wird, der zur Bindung des Farbstoffes führt.

II. 2. Schädigung und Reparatur nach Röntgenbestrahlung

Wie in bakteriellen Systemen ist auch in Säugetierzellen die Erfassung von Schäden und Reparaturprozessen nach Röntgenbestrahlung schwieriger als nach UV-Bestrahlung. Daher stellt die Reproduktivität bestrahlter Zellen, die sich in der unbegrenzten Proliferation äußert, ein wichtiges Maß zur Erfassung der Strahlenschädigung dar. Das breite Spektrum von Röntgenschäden wird u.a. durch die unterschiedliche Teilungsfähigkeit bestrahlter Zellen aufgezeigt (134): Zellen, die nach Röntgenbestrahlung die unbegrenzte Proliferationsfähigkeit wiedererlangt haben, können eine sehr unterschiedliche Zahl von Zellen pro Clon produzieren. Ebenso kann die Fraktion der Zellen, die die Fähigkeit zur unbegrenzten Proliferation verloren hat, sich noch einige Male teilen. Es muß daher zwischen folgenden Möglichkeiten des Strahleneffekts unterschieden werden:

1. Die Zellen verlieren völlig die Teilungsfähigkeit, ein Teil der Zellen entwickelt sich zu Riesenzellen.
2. Die Zellen teilen sich in begrenztem Umfang und produzieren eine begrenzte Nachkommenschaft.
3. Die Zellen haben die unbegrenzte Proliferationsfähigkeit wiedererlangt, aber die Zahl der Zellen

pro Clon nimmt langsamer zu als in unbestrahlten Kontrollen bzw. es treten von der ursprünglichen Zellreihe abweichende Mutationen auf.

4. Die Zellen zeigen keine meßbare Hemmung in ihrer Proliferationsfähigkeit.

Während die Schäden nach 1 und 2 in einem Abriß der Lebensfähigkeit sichtbar werden, bieten 3 und 4 ein weites Feld von Unterscheidungsmöglichkeiten, die von der Erfassung der Clon-Größe bis zur Etablierung strahlenresistenter Mutanten reichen (109, 135-139).

Bei der Erfassung von Reparaturvorgängen nach Röntgenbestrahlung fanden z.T. die gleichen Versuchsanordnungen wie bei Arbeiten mit UV-Strahlung Anwendung. So ist auch bei der Darstellung von Röntgenschäden die Aufnahme der Dosis-Effektkurven ein geeignetes Kriterium. Die Ausbildung einer Schulter in der Dosis-Effekt-Kurve ist ein Hinweis für die Akkumulierung subletaler Schäden. Diese subletalen Schäden konnten Phillips und Tolmach (140) in HeLa S_3 -Zellen mit Hilfe der Kolonieformfähigkeit zeigen. Durch Inkubation der röntgenbestrahlten Zellen in Fluordesoxyuridin- bzw. Oxyharnstoff-haltigem Medium in nicht-toxischen Konzentrationen bewirkten beide Hemmstoffe einen starken Abfall der Überlebenskurve gegenüber bestrahlten, in normalem Medium inkubierten Zellen.

Eine Untersuchung der Strahlenwirkung auf die einzelnen Phasen synchronisierter Zellen zeigte, daß die Strahlenempfindlichkeit wie bei UV-bestrahlten Zellen während der einzelnen Phasen sehr unterschiedlich ist. So sind die Zellen während der Mitose und in der G_2 -Phase am empfindlichsten, in der G_1 - und in der frühen S-Phase nimmt die Sensitivität ab und erreicht in der

späten S-Phase ein Minimum (106, 141), was mit Untersuchungen über röntgen-induzierte Strangbrüche übereinstimmt. Während des Übergangs von S zu G_2 (späte S-Phase) werden nämlich weniger Strangbrüche verursacht als in den übrigen Phasen (142). Diese Ergebnisse treffen für alle bisher untersuchten Zellreihen (141 - 145) mit Ausnahme von sehr langsam proliferierenden menschlichen Amnionzellen zu: Die Zellen wurden direkt aus menschlichem Gewebe gewonnen. Ihre Generationszeit betrug 14 - 20 Tage, während S- und G_2 -Phase jeweils 24 Stunden betrugen. Diese Zellreihe wies eine starke Verzögerung des Überganges der bestrahlten Zellen von G_1 nach S auf, entsprach aber während des übrigen Zyklus den schnell proliferierenden Zellen (146). Dieses Verhalten ist insofern von Interesse, als es dem Verhalten von Zellen, die im natürlichen Gewebsverband bestrahlt werden, entsprechen dürfte.

Wie nach UV-Bestrahlung kommt es in Säugetierzellen auch nach Röntgenstrahleneinwirkung zu einer dosisabhängigen Abnahme der normalen DNS-Synthese (147 - 149), während in einer Reihe von Zellkulturen eine Reparatur-Replikation bzw. unkontrollierte DNS-Synthese stattfindet (150 - 154). Durch Einbau von halogen-substituierten Basenanalogen vor der Bestrahlung wird diese Reparatur-Replikation erheblich gesteigert (150, 155). Die Synthesetätigkeit der Zellen kann sowohl durch den Einbau markierter Nucleoside, Nucleotide als auch makromolekularer DNS nachgewiesen werden (156 - 158)

Einen ersten Beweis, daß es sich bei der Reparatur-Replikation wirklich um einen die Überlebensfähigkeit der Zellen fördernden Prozeß handelt, konnten Petrovic et al. (158) erbringen. Sie zeigten, daß die Koloniefähigkeit bestrahlter Zellen durch Zugabe von exo-

gener DNS, Nucleotiden oder Nucleosiden nach der Bestrahlung gesteigert wird und mit der DNS-Synthese übereinstimmt.

Eine weitere Möglichkeit zur Erfassung von Röntgenstrahlenschäden bietet der Nachweis von Strangbrüchen mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation. Nach verschiedenen langen Inkubationszeiten konnten in unterschiedlichen Zellreihen eine Abnahme der Strangbrüche nachgewiesen werden (142, 159 - 162).

B. Ziel der eigenen Untersuchungen

In der vorliegenden Arbeit soll das strahlenbiologische Verhalten von H. Ep. 2 - Zellen (human epidermoid cells) untersucht werden. Insbesondere sollen die Zellen auf das Vorhandensein von Reparaturmechanismen untersucht werden.

1. Mit Hilfe von Dosis-Effekt-Kurven soll anhand der Kriterien Proliferationsvermögen und Koloniefähigkeit der Zellen die Wirkung von UV- und Röntgenbestrahlung aufgezeigt werden. Gleichzeitig soll untersucht werden, ob nichttoxische Konzentrationen von Coffein und Oxyharnstoff das Wachstum bestrahlter Zellen hemmen und somit möglicherweise Reparatur-Prozesse unterbinden.

2. Das Ausmaß der strahlenchemischen Wirkung des ultravioletten Lichtes soll durch den quantitativen Nachweis von Pyrimidin - Dimeren in der säureunlöslichen Fraktion der Zellen beurteilt werden. Ein eventueller Reparaturmechanismus von UV - Schäden soll durch den Nachweis der Eliminierung der UV-induzierten Pyrimidin-Dimeren aufgezeigt werden.

3. Parallel zu einer eventuellen Eliminierung von UV-Photoprodukten soll das Ausmaß des strahleninduzierten DNS-Abbaus untersucht werden, indem die Abgabe von Aktivität durch bestrahlte und unbestrahlte ^3H -TdR-markierte Zellen an das Inkubationsmedium gemessen wird.

4. Es soll überprüft werden, ob zwischen der in Säugerzellen nachgewiesenen Reparatur-Replikation bzw. außerplanmäßigen DNS-Synthese (76,113,118) und der Eli-

minierung von Pyrimidin-Dimeren ein Zusammenhang besteht. Eine außerplanmäßige DNS-Synthese soll durch den Einbau von ^3H -TdR in die säureunlösliche Fraktion der Zellen in Gegenwart von Oxyharnstoff nachgewiesen werden.

C. Material und Methodik

1. Züchtung der Zellen

Die untersuchte Zellreihe H. Ep. 2 (human epidermoid 2 cells) wurde 1952/53 von Fjelde (163) von einem an einem Larynx-Carcinom erkrankten Patienten gewonnen und seither in ständiger Kultur gehalten. Damit stellt H. Ep.2 neben HeLa-Zellen eine der ältesten Zellkulturen dar, die noch Verwendung finden. Die Zellstämme wurden uns von Prof. Dr. K.O. Habermehl, Städt. Wenckebach-Krankenhaus, Berlin-Tempelhof, und Prof. Dr. Voß, Robert-Koch-Institut, Berlin, zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden in Eagle's "minimal essential medium" (164) mit Glutaminsäure und nicht-essentiellen Aminosäuren (Grand Island Biological Comp., N. Y.) mit einem Zusatz von 10 % Hitze-inaktiviertem Kälberserum (Flow Chemicals, Irvine, Schottland) gezüchtet. Die Hitze-Inaktivierung des Serums erfolgte durch 30minütiges Erhitzen im Wasserbad auf 56°C. Ferner wurden dem Medium 100 i.E./ml Penicillin-G-Na und 100 µg/ml Streptomycinsulfat (Farbwerke Hoechst) zugesetzt. Der pH-Wert des Mediums wurde nach Zusatz von 2,2 g/l Natriumhydrogenkarbonat mit 1 n-Salzsäure auf pH 6,8 - 7 eingestellt. Das komplette Medium wurde mit Membranfiltern (Porenweite 0,2 µ, Sartorius, Göttingen) sterilfiltriert.

Die Zellen wurden als Zellrasen (monolayer) in Roux-Flaschen oder kleinen Gewebekulturflaschen (10x4x4 cm) ohne zusätzliche Begasung gezüchtet. Für Bestrahlungsversuche und Untersuchungen mit Hilfe der Kolonieformfähigkeit wurden die Zellen in Glaspetrischalen in feuchter 5 % CO₂-haltiger Atmosphäre gezüchtet. Die Inkubationstemperatur betrug stets 37°C.

Die Zellen wurden alle 2 - 3 Tage passagiert, wobei in der Regel eine Verdünnung 1 : 3 erfolgte. Zur Passage und zur chemischen Aufarbeitung wurden die Zellen durch 5-minütige Einwirkung von phosphatgepuffertem Trypsin-AEDTA-Lösung von der Glaswand abgelöst (Trypsin, Nutritional Biochemical Corp., Cleveland, USA). Anschließend wurden die Zellen 5 Minuten lang bei 800 g zentrifugiert und in Medium resuspendiert.

Durch diese Behandlung wurden die Zellen nicht geschädigt und in ihrer Proliferation nur geringfügig verzögert. Ein Abbau markierter DNS ist nach Snow und Allen (1965) durch kristallisiertes Trypsin nicht zu erwarten.

2. Zubereitung der Trypsin-AEDTA-Lösung

a. Zusammensetzung der phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS):

NaCl	8,0
KCl	0,2
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,15
KH_2PO_4	0,2
MgCl_2	0,1
CaCl_2	0,1 g
dest. Wasser	ad 1000,0 ml

Um die Fällung unlöslicher Phosphate zu vermeiden, wurden MgCl_2 und CaCl_2 in 50 ml Wasser gelöst, getrennt von der restlichen Salzlösung, autoklaviert. Die beiden Lösungen wurden erst nach völligem Erkalten vereinigt.

b. Herstellung der Trypsin-AEDTA-Lösung

Zur Herstellung von 3 l Trypsin-AEDTA-Lösung wurden 3,0 g Trypsin in 300 ml auf 37°C angewärmter PBS 15 Minuten

lang im Brutschrank gerührt und anschließend 20 Minuten lang bei 3000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit PBS zu 2,925 l aufgefüllt. Dieser Lösung wurden 75 ml 0,1 M AEDTA-Lösung (Titriplex III, Merck Nr. 8431) zugesetzt.

Die Lösung wurde membranfiltriert und in Portionen für einmaligen Gebrauch abgefüllt.

3. Sterilitätskontrollen

Um Fehlinterpretationen durch mikrobielle Verunreinigungen der Zellen auszuschließen, wurde die Zellkultur regelmäßig den Sterilitätskontrollen des DAB 7 mit der Ausnahme unterworfen, daß statt Thioglykolatbouillon Leberbouillon verwendet wurde. Ferner wurde auf Mykoplasmen mit 10 % Pferdeserum-haltigem Agar und mit Myk oplasma-Nährböden (Flow Chemicals) geprüft, indem Zellen und Inkubationsmedium auf diese Nährböden aufgetragen und mindestens 3 Wochen in feuchter aerober Atmosphäre mit und ohne erhöhte CO₂-Spannung bebrütet wurden. +)

Auf Mykoplasma-Freiheit wurde weiterhin mit Hilfe einer Orceinfärbung der Zellen geprüft, indem Zellen auf einem Deckglas mit Essigsäure fixiert und mit 1 % Orcein-Lösung gefärbt wurden. Bei mikroskopischer Betrachtung sind Mykoplasmen bei dieser Methode an der Zellwand zu erkennen.

+) Ich danke Herrn Prof. Dr. K. Großgebauer, Inst. für Hygiene und med. Mikrobiologie für die Überlassung der Mykoplasma-Nährböden und Frau Stoebe, Institut für Veterinär-Hygiene, für die Hilfe bei der Untersuchung auf Mykoplasmen.

4. Markieren der Zellen

Die Zellen wurden durch Inkubation in ^3H -TdR (methyl- ^3H)-haltigem Medium, spezifische Aktivität 27,8 Curie/mmol, Radiochemical Centre, Amersham, in einer Endkonzentration von 2 - 5 $\mu\text{Ci/ml}$ markiert. Die Markierungszeit betrug 3 - 24 Stunden.

5. Strahlenquellen und Dosimetrie

a. UV-Dosimetrie

Als UV-Strahlenquelle wurde eine Quecksilber-Niederdruck-Lampe, NK 30/89-PL 390, der Quarzlampengesellschaft Hanau, verwendet, die vorzugsweise Licht der Wellenlänge 254 nm abgibt.

Die UV-Dosimetrie wurde von Hartmann (24) übernommen. Die Meßmethode beruhte auf der Umwandlung von UV-Licht in eine Fluoreszenzstrahlung. Die Fluoreszenzstrahlung wurde photoelektrisch gemessen. Es wurden folgende Werte übernommen:

Lampenabstand	10 cm =	271	$\text{Erg/mm}^2 \times \text{sec}$
	70 cm =	37,4	$\text{Erg/mm}^2 \times \text{sec}$
	140 cm =	11,95	$\text{Erg/mm}^2 \times \text{sec}$

b. Röntgendosimetrie

Die Röntgenbestrahlung erfolgte mit dem Gerät RT 250 der Fa. C.A. Müller, Hamburg, unter folgenden Bedingungen: 130 kv, 13,5 mA, 2 mm Al-Filter.

Die Röntgendosimetrie wurde unter exakter Beibehaltung der einzelnen Versuchsanordnungen unter Verwen-

dung von Fricke-Lösung (166) vorgenommen. Die zu bestrahlenden Zellen (+ Medium) waren dabei durch eine Lösung von 10^{-3} molar $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ und 10^{-3} molar NaCl in 0,1 normaler H_2SO_4 ersetzt. Die Extinktionsänderung wurde in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit aufgezeichnet.

Die absorbierte Dosis wurde berechnet nach der Formel:

$$D = \frac{1,602 \times 10^{-15} \times N \times E}{E_M \times D \times G} \quad \text{rad}$$

- $1,602 \times 10^{-15}$ = Umrechnungsfaktor eV in erg $\times 10^{-3}$
 N = Loschmidtsche Zahl = $6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
 E = bei 25°C gemessene Extinktion
 E_M = molare Extinktion von Fe^{+++} , gemessen in 0,1 n H_2SO_4 bei 25°C = 1,00 g/ml
 G = radiochemische Ausbeute = 14,5 Ionen Fe^{+++} pro 100 eV

Für eine Schale im Durchmesser von 4,5 cm mit 6 ml Lösung wurde bei 130 kv, 13,5 mA und 2 mm Aluminium-Filter im Abstand von 121 mm eine Dosis-Leistung von 2 krad in 1' 35" gemessen bzw. errechnet.⁺⁾

^{+) Ich danke Frau Aichele, Institut für Hygiene und med. Mikrobiologie, für die Hilfe bei der Röntgendosimetrie.}

6. Dosis-effekt-Kurven

Dosis-Effekt-Kurven wurden ermittelt, indem zum einen die Wirkung des Agens auf die Proliferation der Zellen unmittelbar nach der Applikation ermittelt wurde und zum anderen durch Erfassung der Langzeitwirkung mit Hilfe der Kolonieformfähigkeit.

a. Erfassung der Proliferationsfähigkeit:

Wirkungen auf die Zellen unmittelbar nach Applikation der Agenzien (2 - 4 Generationszeiten) wurden untersucht, indem etwa 200 000 Zellen für 24 Stunden in Petrischalen oder kleinen Kulturflaschen inkubiert wurden, so daß alle Zellen am Glasboden anheften und 1 - 2 Teilungen durchführen konnten. Anschließend wurden die Bestrahlungen vorgenommen bzw. die Hemmstoffe zugesetzt und die Inkubation für 48 Stunden fortgesetzt. Nach Abschluß dieser Inkubation wurden die Zellen abtrypsiniert, in einer abgemessenen Menge Medium (1 - 5 ml) suspendiert und in einer Zählkammer ausgezählt. Um anschließend die Proliferation nach Applikation des zu untersuchenden Agens zu erfassen, wurde stets die Zahl der Zellen bestimmt, die zum Zeitpunkt der Bestrahlung oder des Zusatzes der Hemmstoffe bereits gewachsen waren und dieser Wert von der nach Abschluß der Inkubation ermittelten Zellzahl abgezogen. Die einzelnen Werte wurden erhalten, indem je Dosis zwei Proben angesetzt und je Probe 4 x 12 Felder der Zählkammer ausgezählt wurden.

b. Untersuchungen mit Hilfe der Kolonieformfähigkeit

Zur Untersuchung der Kolonieformfähigkeit wurden stets soviel Zellen eingesät, daß sich nach Applikation der Hemmstoffe bzw. nach der Bestrahlung 100 - 200 Kolonien

pro Schale entwickelten. Hierzu wurden Verdünnungsreihen hergestellt, die eine Einsaat von 200, 1000, 5000 und 10 000 Zellen in 3 ml Medium ermöglichten. Die Einsaat erfolgte in 3 ml Medium in Petrischalen mit einem Innendurchmesser von 4,5 cm.

Vor Zusatz von Hemmstoffen und vor UV-Bestrahlung wurden die eingesaten Zellen 24 Stunden lang inkubiert, so daß sich Mikrokolonien aus 2 - 3 Zellen bilden konnten.

Für die UV-Bestrahlung wurde das Medium abgesaugt, die Bestrahlung durchgeführt und die Zellen sofort mit Inkubationsmedium (5 ml/Schale) bedeckt. Ein möglicher Schutzeffekt durch an den Zellen anhaftendes Medium mußte in Kauf genommen werden, da durch Waschen und bedecken der Zellen mit Eiweiß- und Farbstoff-freien Pufferlösungen einzelne Mikrokolonien abgelöst wurden, was zu nicht reproduzierbaren Werten führte.

Nach der Bestrahlung wurden die Zellen in abgeschlossenen Glasbehältern in feuchter 5 % CO₂-haltiger Atmosphäre 12 - 14 Tage lang inkubiert. Während dieser Zeit bilden sich aus unbehandelten Zellen Kolonien mit bis zu 300 Zellen aus. Beim Auszählen wurde als Kriterium für die Erhaltung bzw. Wiedererlangung der Koloniefähigkeit die Ausbildung von mindestens 50 Zellen pro Kolonie gesetzt. Es darf angenommen werden, daß diese Zellen die unbegrenzte Proliferationsfähigkeit bewahrt bzw. wiedererlangt haben.

Bei der Untersuchung der Koloniefähigkeit nach Röntgenbestrahlung wurde die Methode insoweit geändert, als die Zellen mit Medium bedeckt bestrahlt wurden (6ml/Schale).

Alle Bestrahlungen wurden bei Zimmertemperatur (20 - 22°C) durchgeführt. Die Petrischalen wurden jedoch nur für die zur Bestrahlung notwendigen Vorgänge aus dem Brutschrank genommen und nach der Bestrahlung unmittelbar wieder zurückgestellt. Ebenso wurden Medienwechsel stets mit auf 37°C angewärmtem Medium durchgeführt. Zum Auszählen wurden die Kolonien mit 1 % Methylblau-Lösung gefärbt. Das Auszählen erfolgte unter einem Plattenmikroskop.

7. Anwendung von Inhibitoren

Als Inhibitoren wurden Coffein und Oxyharnstoff verwendet, von denen 0,1 molare Stammlösungen hergestellt und nach Bedarf mit Medium verdünnt wurden. Coffein wurde als Lösung in destilliertem Wasser autoklaviert und die Stammlösung bei -18°C aufbewahrt. Oxyharnstoff⁺⁾ wurde kalt in destilliertem Wasser gelöst und anschließend sterilfiltriert. Oxyharnstofflösungen wurden stets unmittelbar vor Gebrauch frisch hergestellt.

8. Nachweis von dimerem Thymin

a. Bestrahlen der Zellen

Zum Nachweis von dimerem Thymin nach UV-Bestrahlung wurden etwa 10^7 Zellen in Glaspetrischalen (13,5 cm) in 40 ml ^3H -TdR-haltigem Medium (2 μ Ci/ml) 24 Stunden lang inkubiert. Zum Bestrahlen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit 20 ml Puffer-Lösung (PBS) gewaschen und mit einer 2 mm hohen Schicht PBS bedeckt. Die Bestrahlung erfolgte bei einem Lampenabstand von 70 cm. Unmittelbar nach der Bestrahlung

⁺⁾ Schuchardt, München

wurden die Zellen entweder aufgearbeitet oder die PBS-Lösung durch frisches Medium ersetzt und die Zellen für die angegebenen Zeiten in 5 % CO_2 -haltiger Atmosphäre bei 37°C inkubiert.

b. Aufarbeiten der Zellen

1. Trichloressigsäure-lösliche Fraktion

Zur Bestimmung der Thymin-Dimeren in der DNS wurden die Zellen abtrypsiniert, mit PBS gewaschen und anschließend 45 Minuten lang bei 4°C mit 5 % Trichloressigsäure-Lösung (TCE) extrahiert. Danach wurde die TCE durch Zentrifugieren abgetrennt, der Rückstand nochmals mit 5 % TCE digeriert und erneut abzentrifugiert. Die beiden TCE-Fractionen wurden vereint und bildeten die säurelösliche Fraktion, die vorwiegend niedermolekulare Zellbestandteile enthielt. Der Rückstand stellte die säureunlösliche Fraktion dar, die vorwiegend höhermolekulare Zellbestandteile, insbesondere die DNS enthielt.

Die säurelösliche Fraktion wurde zum Entfernen der TCE zweimal ausgeäthert, wodurch der pH-Wert der Lösung auf etwa 5 anstieg. Anschließend wurde die säurelösliche Fraktion auf dem Wasserbad eingedampft und der Rückstand zur Hydrolyse in Trifluoressigsäure aufgenommen.

2. TCE-unlösliche Fraktion

Die säureunlösliche Fraktion wurde zur Abtrennung der TCE je zweimal mit 2 ml Äthanol 95 %, Äthanol-Äther 1 : 1, und reinem Äther gewaschen und nach kurzem Trocknen in 2 - 3 ml Trifluoressigsäure aufgenommen.

3. Hydrolyse

Zur Hydrolyse der beiden Zellfraktionen wurden die in Trifluoressigsäure aufgenommene Zellanteile in dickwandigen an der Wasserstrahlpumpe auf 120 mm Hg evakuierten Glasampullen eingeschmolzen und 90 Minuten lang im Heißluftofen auf 175°C erhitzt. Wie Greulich (62) zeigen konnte, wird durch die Trifluoressigsäure-Hydrolyse nur etwa 1 % des dimeren Thymins wieder monomerisiert.

c. Chromatographie

Nach erfolgter Hydrolyse wurde die Trifluoressigsäure an der Wasserstrahlpumpe abgezogen, das Hydrolysat in 1 ml Wasser quantitativ aufgenommen und auf eine 8 cm hohe Amberlite IRC 50 - Säule (Rohm und Haas comp., Philadelphia, USA) gegeben und mit 25 ml Wasser eluiert. Hierbei passieren sowohl der Thymin- als auch der Dimeren-Anteil quantitativ die Säule, während bei der Hydrolyse entstandene harzige Proteinhydrolysate und Oxydationsprodukte auf der Säule blieben. Diese Auftrennung war notwendig, da sich die harzigen Nebenprodukte bei der anschließenden Papierchromatographie als störend erwiesen. Die Amberlite IRC-50-Säulenchromatographie wurde experimentell aus einer Reihe verschiedener Austauschere ermittelt, da die Auftrennung derart erfolgte, daß zuerst die Pyrimidin-Dimeren und in unmittelbarer Folge das monomere Thymin eluiert wurden. Bei der anschließenden Regeneration der Säule mit 1 % HCl wurden nur 0,35 % der Gesamtaktivität als resorbierte Restaktivität eluiert.

Da auch mit höheren Amberlite-IRC-50-Säulen eine quantitative Auftrennung in dimeres und monomeres Thymin nur unvollständig gelang, erfolgte die Auftrennung papier-

chromatographisch. Hierzu wurde das Eluat der Amberlite-Säule zur Trockene eingedampft, in 0,1 ml Wasser wieder aufgenommen und auf Chromatographiepapier (Schleicher und Schüll Nr. 2043 b G1) aufgetragen. Die Papierchromatographie erfolgte in dem System:

n-Butanol : Eisessig : Wasser = 200 : 30 : 75

Die RF-Werte einiger Purine, Pyrimidine und Bestrahlungsprodukte der DNS sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Substanz	RF-Werte im System n-BU:Eisessig:H ₂ O = 200:30:75
Thymin	0,60
Uracil	0,48
Cytosin	0,33
Adenin	0,53
Guanin	0,22
TT	0,27
UT	0,20
UU	0,10
Harnstoff	0,45

Tab. 2 : RF-Werte von Purinen, Pyrimidinen und einigen UV-Bestrahlungsprodukten der DNS, Schwankungsbreite $\pm 0,02$ (nach Greulich, 62)

d. Herstellung von dimerem Thymin

Zur vergleichenden RF-Wertbestimmung sowie zur Erprobung verschiedener Chromatographie- bzw. Austauschersäulen

wurde ein Gemisch aus monomerem und dimerem Thymin hergestellt. Hierzu wurden 5 ml einer Thymin-Lösung (400 µg/ml) in gefrorenem Zustand bei -18°C über Trockeneis 30 Minuten lang bestrahlt. Der Anteil an radioaktivem Thymin-2- ^{14}C betrug 2,5 µCi/ml, die UV-Dosis betrug unter diesen Bedingungen etwa $1,46 \times 10^6$ Erg/mm².

Eine papierchromatographische Auftrennung ergab, daß die Lösung nach der Bestrahlung annähernd 90 % dimeres Thymin enthielt.

9. Radioaktivitätsmessung

Die Messung der Radioaktivitätsverteilung erfolgte mit einem Dünnschichtscanner II der Fa. Berthold-Friesseke, Karlsruhe-Durchlach, in Verbindung mit dem Strahlenmeßgerät FH 49 A und einem Potentiometerschreiber der Fa. Friesseke und Höpfner, Erlangen.

Als Zählgas wurde eine Mischung aus 10 % Methan mit 90 % Argon verwendet. Dabei wurden folgende Daten eingehalten:

Hochspannung:	1700 Volt
Eingangsempfindlichkeit:	250 mV
Vorschub:	120 - 1200 mm/h
Dämpfung:	3 - 60 sec

Das Transportgerät (LB 2723) und der Schreiberstreifen hatten die gleiche Vorschubgeschwindigkeit.

Die Radioaktivitätskurve wurden gravimetrisch ausgewertet. Dazu wurden die "Peaks" ausgeschnitten und gewogen. Die Summe der "Peaks" wurde als 100 % Aktivität angesetzt,

die sich auf monomeres Thymin und die Pyrimidin-Dimeren verteilten. Die zu beiden Anteilen gehörende Aktivität wurde als prozentualer Anteil der Gesamtaktivität ermittelt.

Für die Bestimmung der Einbaurrate wurden die Impulse pro Minute mit Hilfe des Meßgerätes ermittelt (siehe unten).

10. Bestimmung der Einbaurrate und des DNS-Abbaus markierter Zellen

Zur Bestimmung der Einbaurrate von ^3H -TdR in die DNS in Abhängigkeit von UV- und Röntgenbestrahlung wurden die Zellen nach der Bestrahlung für die angegebenen Zeiten in ^3H -TdR-haltigem Medium (2 und 5 $\mu\text{Ci/ml}$) inkubiert.

Die Einbaurrate wurde modifiziert nach Wenzel (167) bestimmt. Hierzu wurden die abtrypsinierten Zellen mit PBS gewaschen, 45 Minuten lang bei 4°C mit 5 % TCE extrahiert und in säurelösliche und unlösliche Fraktionen aufgetrennt. Die säurelösliche Fraktion wurde verworfen, während die säureunlösliche Fraktion je zweimal mit Äthanol 95 %, Äthanol-Äther (1:1) und mit reinem Äther gewaschen wurde. Dieser Rückstand wurde in 2 ml 2 % Ammoniaklösung gelöst, der eine Spur eines Geschirrspülmittels (Pril) zugesetzt wurde. Die Aktivität dieser Lösung wurde in den Verdünnungen 1 : 5 und 1 : 10 gemessen, indem jeweils 4 x 0,1 ml Lösung in Quadraten von 3 cm Kantenlänge auf eine Glasplatte aufgetragen und nach dem Antrocknen die Impulsrate mit dem Scanner bestimmt wurde.

Die von bestrahlten markierten Zellen an das Inkubationsmedium abgegebene Aktivität wurde bestimmt, indem zum

einen die Aktivität in den Zellen (s. S. 59) und zum anderen die Aktivität im Inkubationsmedium bestimmt wurde. Hierzu wurde das Medium unverdünnt und in den Verdünnungen 1 : 10 und 1 : 20 in der angegebenen Weise gemessen. Die Verdünnungen waren notwendig, um sicherzustellen, daß die maximale Impulsrate gemessen wurde (s. S. 107). Die auf die Glasplatten aufgetragenen Substanzmengen betrugen unter diesen Bedingungen 5 - 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, die Meßausbeute bis zu 45 %.

Die Quadrate auf den Glasplatten wurden mit einem Plastiklackfilzschreiber aufgetragen und durch Erhitzen auf 180° C im Trockenschrank fixiert,

D. Ergebnisse

I. Definitionen

Zur Beurteilung der Kolonieformfähigkeit und der Proliferation der Zellen nach UV- und Röntgenbestrahlung wurde in Dosis-Effekt-Kurven der Bruchteil der Überlebenden über die Dosis aufgetragen. Die Überlebensrate wurde logarithmisch und die Dosis linear aufgetragen. Hierbei können sich unterschiedliche Verläufe der Kurven ergeben, wie sie in Abbildung 7 schematisch dargestellt sind.

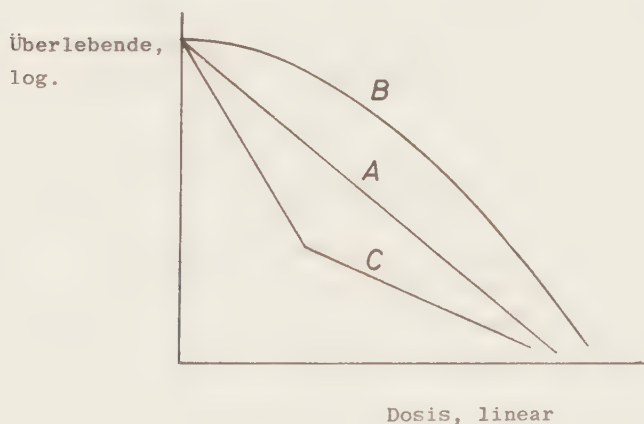


Abb. 7: Schematische Darstellung unterschiedlich verlaufender Inaktivierungskurven.
A = gradlinige Eintrefferkurve
B = schulterförmige Mehrtrefferkurve
C = abgeknickte Kurve mit resistantem Schwanz

Die gradlinige Kurve des Typs A stellt eine sogenannte Eintrefferkurve dar, die besagt, daß alle Teile der un-

tersuchten Kultur einheitlich empfindlich gegenüber dem angreifenden Agens sind. Für Strahlen-Dosis-Effekt-Kurven bedeutet dies, daß bereits ein Treffer im Target des Mikroorganismus, z.B. der DNS, zum vollständigen Verlust der beobachteten Leistung (z.B. Kolonieformfähigkeit) führt.

Typ B zeigt eine Mehrtreffer- oder Schulter-Kurve, die besagt, daß erst mehrere Treffer im Treffbereich zum vollständigen Verlust der beobachteten Leistung führen (185).

Typ C zeigt eine Inaktivierungskurve mit resistantem Schwanz. Sie kommt meist dadurch zustande, daß sich das biologische Objekt aus unterschiedlich resistenten Fraktionen zusammensetzt.

II. Untersuchung der Kolonieformfähigkeit der Zellen

Als Kriterium der Erhaltung bzw. Wiedererlangung der Kolonieformfähigkeit der Zellen wurde die Ausbildung von mindestens 50 Kolonien während einer Inkubationszeit von 10 - 12 Tagen gesetzt.

Zunächst war es notwendig, die Reproduzierbarkeit von abgemessener Einsaat und Kolonieformfähigkeit zu untersuchen. Gleichzeitig sollte geprüft werden, ob die Zellkonzentration der Einsaat einen Einfluß auf die Kolonieformfähigkeit der Zellen hat. Hierzu wurden mit Hilfe einer Verdünnungsreihe in jeweils 12 Petrischalen (Durchmesser 4,5 cm) etwa 14, 70, 140, 700 und 1400 Zellen in 3 ml Medium eingesät (1389 Zellen im Mittel, ausgezählt mit einer Zählkammer). Die nach 10 Tagen Inkubation ausgebildeten Kolonien sind in Tabelle 3 wiedergegeben. Das Auszählen der Kolonien ergab bei einer Ein-

satz von 1400 Zellen/Schale und in geringerem Ausmaß auch bei 700 Zellen/Schale Kolonieverbände, in denen die einzelnen Kolonien mikroskopisch nur schwer voneinander abzugrenzen waren. Es lag daher nahe, daß mehrere Zellen zusammen eine Kolonie ausgebildet hatten, woraus die relative Abnahme der Koloniebildungsrate mit steigender Einsatz zu erklären wäre.

Einsatz	14	70	140	700	1400	Zellen/Schale
	7	51	125	650	973 +	ausgebildete Kolonien
	12	43	133	613	1214 +	
	8	69	128	629	1145 +	
	0	62	123	636	988 +	
	13	70	119	631	867 +	
	1	59	116	607	1209 +	
	2	65	123	636	1098 +	
	9	69	121	611	1130 +	
	12	61	129	580 +	1076 +	
	6	60	134	591 +	1054 +	
	6	62	131	626	1148 +	
	4	57	128	611	1238 +	
	80	734	1510	7421	13140	Summe
	6,7	61	126	618	1095	Mittelwert
	4,3	6,7	5,6	20,1	110	Standardabweichung
	47,6	87	90	88	78	% Kolonien/Einsatz

Tab. 3: Untersuchung der Kolonieformfähigkeit in Abhängigkeit von der Einsatz. Mit + gekennzeichnete Kolonien waren wegen ineinandergewachsener Kolonien nur ungenau zu zählen. Die Standardabweichung wurde nach der im Text angegebenen Formel berechnet.

Für die Berechnung der Standardabweichung s wurde folgende Formel verwendet:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_n (x_n)^2}{n - 1}}$$

Hierbei ist n die Anzahl der Versuche (Zellzählungen)
 f_n die Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert.

III. Nachweis einer Reparatur von Strahlenschäden mit Hilfe von Wachstumskurven

H. Ep. 2 - Zellen sollten sowohl nach UV- als auch nach Röntgenbestrahlung auf Reparaturmechanismen untersucht werden. Als Inhibitoren wurden Coffein und Oxyharnstoff gewählt. Die Auswahl erfolgte unter dem Aspekt der unterschiedlichen Angriffspunkte der beiden Inhibitoren auf Säugetierzellen (s. S. 30 - 31).

Coffein bewirkt in Konzentrationen von 1 - 2 mM/l in Maus-L-Zellen nur eine geringe Hemmung der Koloniefähigkeit (77), während Oxyharnstoff in Säugetierzellen die semikonservative DNS-Synthese bis auf ein Minimum zum Erliegen bringt (88-90). Nach längerer Inkubation in Oxyharnstoff-haltigem Medium konnten Coyle und Strauss (92) in H. Ep. 2 - Zellen ferner Strangbrüche nachweisen.

Es sollte durch parallele Untersuchungen überprüft werden, ob die Hemmwirkung der beiden Inhibitoren auf bestrahlte Zellen auf einer additiven Schädigung oder der Hemmung von Reparaturprozessen beruht.

1. Untersuchung der Zell-Proliferation

a. Hemmung durch Coffein und Oxyharnstoff

Die Untersuchung der Proliferationsfähigkeit der Zellen bietet die Möglichkeit, die Wirkung verschiedener Agenzien unmittelbar nach der Applikation zu untersuchen. Gleichzeitig wird in einer einfachen Versuchsanordnung innerhalb kurzer Zeit ein Rahmen für die tolerierten Strahlendosen und Inhibitor-Konzentrationen gegeben.

Andererseits beinhaltet die Methode der Zellbestimmung eine hohe Fehlermöglichkeit, so daß den Versuchen nur die Aussagekraft von Vorversuchen zukommt.

In Abb. 8 ist die Wirkung steigender Coffein-Konzentrationen auf das Proliferationsvermögen wiedergegeben. Der steile Abfall der Kurve nach Konzentrationen über 5 mM/l Coffein zeigt, daß ein Schwellenwert erreicht ist, nach dessen Überschreiten die Zellen zu keinen Teilungsvorgängen mehr fähig sind.

Sowohl zur Untersuchung der Coffein- als auch der Oxyharnstoff-Wirkung wurden gleiche Anteile einer Zellsuspension (etwa 2×10^5 Zellen) in kleine Kulturflaschen gegeben und 24 Stunden lang inkubiert, um ein Anheften und 1 - 2 Teilungen der Zellen zu ermöglichen. Nach dieser Vorinkubation wurde in 2 Flaschen der Zellgehalt bestimmt, zwei weitere Flaschen wurden als Kontrollen ohne Inhibitor weiterinkubiert und zu den restlichen Flaschen wurde in steigenden Konzentrationen Coffein bzw. Oxyharnstoff zugegeben.

Nach 48 Stunden weiterer Inkubation wurden die Zellen aller Flaschen mit einer Zählkammer ausgezählt. Die

Die Proliferationsfähigkeit der Zellen wurde durch Abzug des nach 24 Stunden Inkubation ermittelten Wertes von der nach 72 Stunden Inkubation ausgezählten Zellzahl bestimmt. Die Werte der Inhibitor-freien Kontrollen wurden gleich 100 % Proliferationsfähigkeit gesetzt.

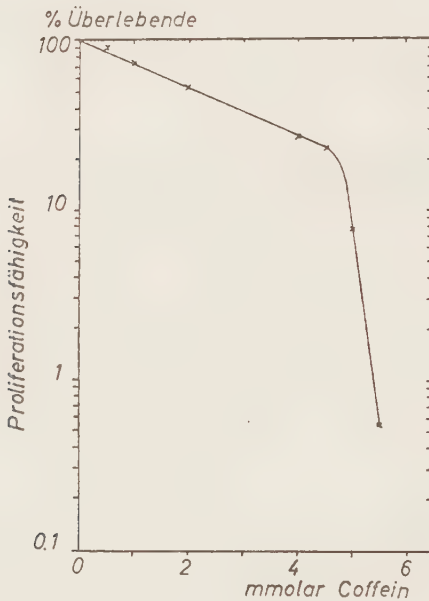


Abb. 8: Prozent Überlebende als Funktion der Coffein-Konzentration, in der die Zellen inkubiert wurden. H. Ep. - 2 - Zellen wurden nach 24 Stunden Vorinkubation in Inhibitor-freiem Medium 48 Stunden lang in Coffein-haltigem Medium inkubiert. In der Abbildung wird ausschließlich die Zellvermehrung während der Inkubation in Inhibitor-haltigem Medium wiedergegeben. Die in diesem Zeitraum in Inhibitor-freiem Medium gewachsenen Zellen wurden gleich 100 % Überlebende gesetzt.

In Abbildung 9 ist die Wirkung von Oxyharnstoff auf die Proliferation der Zellen wiedergegeben.

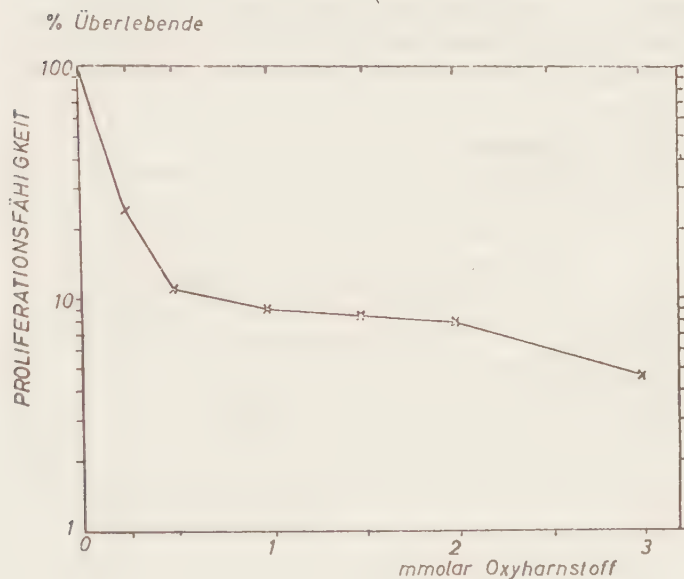


Abb. 9: Prozent Überlebende als Funktion der Oxyharnstoff-Konzentration, in der H. Ep. 2 - Zellen inkubiert wurden.

Die Zellen wurden nach 24 Stunden Vorinkubation in Inhibitor-freiem Medium 48 Stunden lang in Oxyharnstoff-haltigem Medium in steigenden Konzentrationen inkubiert. In der Abbildung wird ausschließlich die Zellvermehrung während der Inkubation in Inhibitor-haltigem Medium wiedergegeben. Die in diesem Zeitraum in Inhibitor-freiem Medium gewachsenen Zellen wurden gleich 100 % Überlebende gesetzt.

b. Hemmung der Proliferation durch UV- und Röntgenstrahlung

Zur Untersuchung des Zusammenwirkens von UV-Strahlung und Coffein auf das Proliferationsvermögen der Zellen wurde die gleiche Versuchsanordnung gewählt wie zur Untersuchung der Hemmung durch Coffein bzw. Oxyharnstoff.

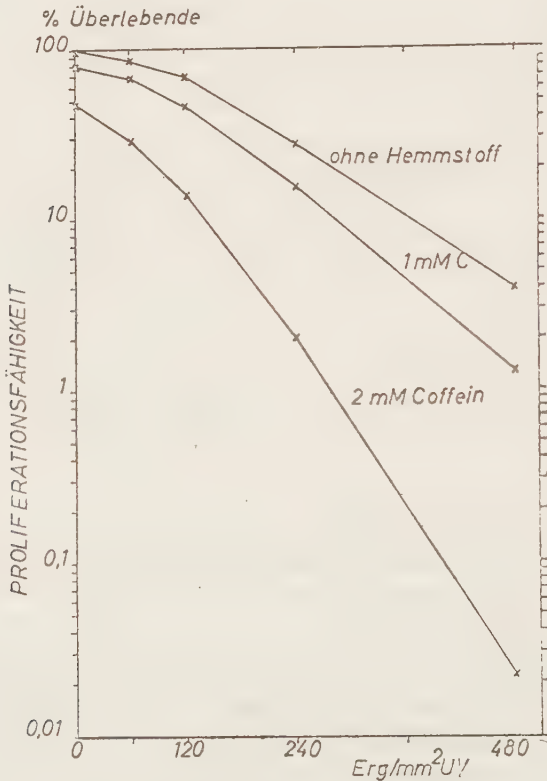


Abb.10: Prozent Überlebende als Funktion der UV-Dosis.

H.Ep. 2-Zellen wurden 24 Stunden nach der Einsaat mit steigenden UV-Dosen bestrahlt und für 48 Std. in Medium ohne sowie mit 1 und 2 mM/l Coffein inkubiert. Die in diesem Zeitraum in den unbehandelten Kontrollen gewachsenen Zellen wurden gleich 100 % Überlebende gesetzt.

Die Zellen wurden jedoch in Glaspetrischalen (8,4 cm Durchmesser) gezüchtet und während der Inkubation mit 5 % CO₂ begast. Zur Bestrahlung wurde das Medium abgesaugt und anschließend durch frisches Medium mit den angegebenen Coffein-Konzentrationen ersetzt und die Zellen für 48 Stunden inkubiert. In den unbestrahlten Kontrollen wurde ebenfalls ein Medienwechsel durchgeführt, um einen Fehler durch Zählen nicht angehefteter Zellen zu vermeiden. Wie aus Abbildung 10 zu ersehen ist, bewirkt UV-Strahlung eine Dosis-abhängige Hemmung der Proliferation, die durch Coffein in den Konzentrationen von 1 und 2 mM/l eindeutig verstärkt wird.

Nach Röntgenbestrahlung wurde dagegen nur eine geringe Hemmung der Proliferation gefunden, die sich im Bereich von 100 - 400 rad als Dosis-unabhängig erwies. Durch Coffein in den Konzentrationen von 1 und 2 mM/l wurde eine Parallelverschiebung der Dosis-Effekt-Kurven bewirkt, die nicht als verstärkte Schädigung angesehen werden kann (Abb. 11).

Zur Untersuchung der Zellproliferation nach Röntgenbestrahlung war eine Abänderung der Versuchsanordnung erforderlich, da unter Beibehaltung der aufgestellten Eichkurve wegen der Größe des Bestrahlungsfeldes nur Schalen mit 4,5 cm Durchmesser verwendet werden konnten. Aus diesem Grund wurden die Zellen in Medium suspendiert bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen in Inhibitor-freiem und Coffein-haltigem Medium aufgenommen und in Glasschalen mit 8,4 cm Durchmesser zur Inkubation verteilt. Die unbestrahlten Kontrollen wurden ebenfalls in Suspension in kleine Petrischalen gegeben und entsprechend den bestrahlten Proben weiterbehandelt. Die Proliferationsfähigkeit wurde durch Abzug der Einsaat von der nach 48 Stunden Inkubation bestimmten Zellzahl ermittelt.

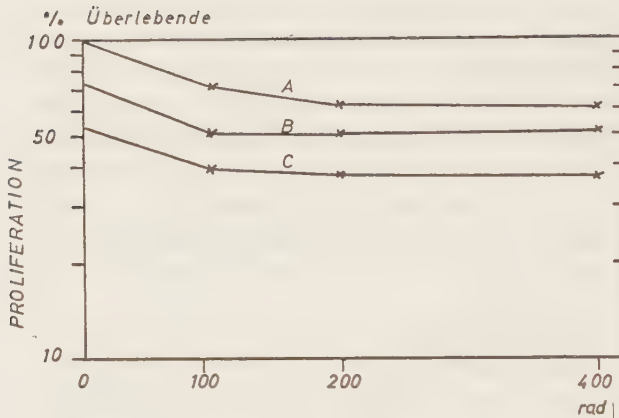


Abb. 11: Prozent Überlebende als Funktion der eingestrahlten Röntgen-Dosis mit und ohne Coffein im Medium. Die Zellen wurden in Suspension bestrahlt und anschließend 48 Stunden in Inhibitor-freiem Medium (A) sowie in Medium mit 1 mM/l (B) und 2 mM/l Coffein (C) inkubiert. Die Zellvermehrung in den Inhibitor-freien unbestrahlten Kontrollen wurde gleich 100 % Überlebende gesetzt.

2. Untersuchung mit Hilfe der Kolonieformfähigkeit

a. Wirkung von Coffein

Zur Untersuchung der Kolonieformfähigkeit von H. Ep. 2-Zellen nach Zusatz von Coffein zum Inkubationsmedium wurden die Zellen in Konzentrationen von 2×10^2 und

1×10^3 Zellen pro Petrischale eingesät. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen wurde das Medium durch Coffein-haltiges Medium in steigenden Konzentrationen ersetzt und die Zellen 12 Tage lang inkubiert. In dieser Zeit bildeten sich in den Inhibitor-freien Kontrollen gut zählbare Kolonien aus. Der Mittelwert der unbehandelten Kontrollen wurde gleich 100 % Überlebende gesetzt.

Die Kolonieformfähigkeit von H. Ep. 2 - Zellen bei permanenter Inkubation in Coffein-haltigem Medium ist in Abbildung 12 wiedergegeben: Bereits in Medium mit 1 mM/l Coffein bildeten gegenüber der Kontrolle nur noch 84 % der Zellen Kolonien aus, während die Koloniebildungsrate nach Zusatz von 2 mM/l Coffein auf 67 % und nach Zusatz von 3 mM/l Coffein auf 13 % gegenüber der Kontrolle sank. Die in Coffein-haltigem Medium ausgebildeten Kolonien waren kleiner als die in den Kontrollen. Nach 12 -tägiger Inkubation in 2 und 3 mM/l Coffein-haltigem Medium erreichte ein erheblicher Anteil der Zellen (bis zu 70%) gerade die Größe von 50 Zellen pro Kolonie, die als Kriterium für die Erhaltung der Kolonieformfähigkeit gesetzt wurde. In den Inhibitor-freien Kontrollen bildeten sich in dieser Zeit Kolonien mit über 300 Zellen aus.

Eine Verlängerung der Inkubationszeit blieb ohne Einfluß auf den Verlauf der Kurve in Abbildung 12, und die Größe der Kolonien nahm nur geringfügig zu.

Da nach diesem Ergebnis nicht ausgeschlossen werden konnte, daß es durch permanente Inkubation UV-bestrahlter Zellen in Coffein-haltigem Medium lediglich zu einer additiven Schädigung der Zellen kommt, wurde unter Beibehaltung der Versuchsanordnung die Hemmung der Kolonieformfähigkeit durch 24-stündige Einwirkung von Coffein auf die Zellen untersucht.

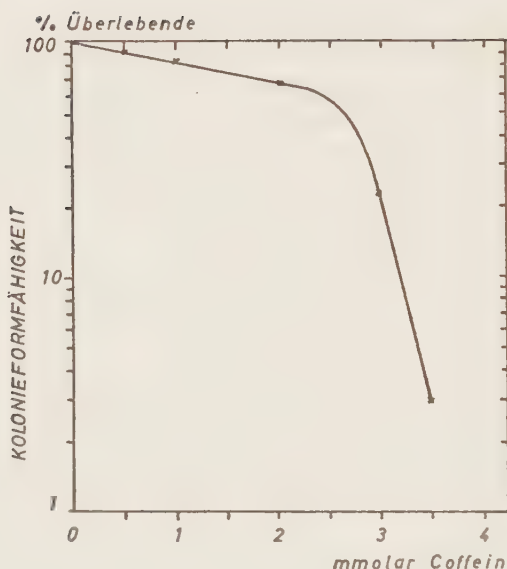


Abb. 12: Prozent Überlebende als Funktion der Coffein-Konzentration

Die Zellen wurden nach 24 Stunden Vorinkubation in Inhibitor-freiem Medium 12 Tage lang in Medium mit steigenden Coffein-Konzentrationen inkubiert.

Die in den Inhibitor-freien Kontrollen ausgebildeten Kolonien wurden gleich 100 % Überlebende gesetzt.

Wie aus Abbildung 13 zu ersehen ist, werden H. Ep. 2 - Zellen durch 24-stündige Inkubation in Coffein-haltigem Medium bis zu Konzentrationen von 4 mM/l nicht in ihrer Kolonieformfähigkeit beeinträchtigt. Nach 24-stündiger Einwirkung von 20 mM/l Coffein waren gegenüber der Kontrolle noch 13 % der Zellen zur Ausbildung von Kolonien

fähig. Diese Kolonien unterschieden sich in ihrer Größe und Zelldichte nicht von Kolonien, die in Inhibitor-freiem Medium gebildet worden waren.

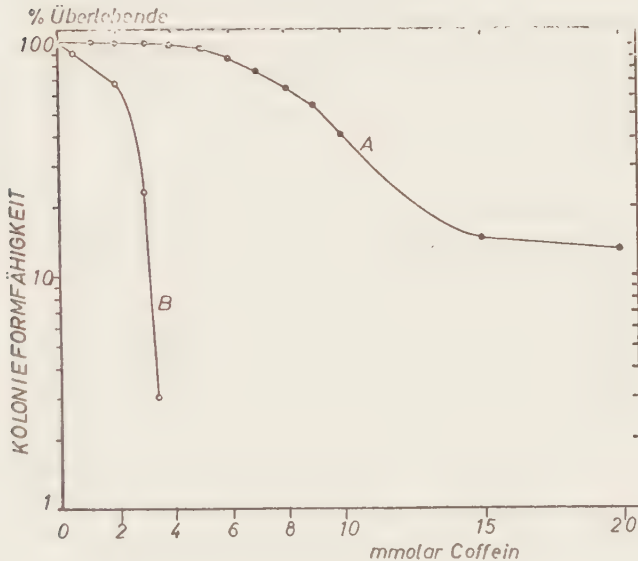


Abb. 13: Prozent Überlebende als Funktion der Coffeinkonzentration in der H. Ep. 2-Zellen für 24 Stunden inkubiert wurden (Kurve A). Die Zellen wurden nach 24-stündiger Vorinkubation in Inhibitor-freiem Medium 24 Stunden lang in Medium mit steigenden Coffeinkonzentrationen und anschließend bis zur Ausbildung zählbarer Kolonien (10 Tage) in Inhibitor-freiem Medium inkubiert (A). Kurve B wurde zum Vergleich aus Abbildung 12 übernommen (Permanente Inkubation in Coffein-haltigem Medium).

b. Untersuchung der Wirkung von Oxyharnstoff auf die Kolonieformfähigkeit

Wegen der bei der Untersuchung der Zellproliferation ermittelten starken Hemmwirkung sowie auf Grund von Ergebnissen, die Coyle und Strauss (92) bei der Untersuchung der Hemmwirkung von Oxyharnstoff auf die Kolonieformfähigkeit von H. Ep. 2 - Zellen fanden, wurde nur die 24-stündige Einwirkung von Oxyharnstoff auf die Zellen untersucht.

Hierzu wurden die Zellen nach 24-stündiger Vorinkubation in Inhibitor-freiem Medium für 24 Stunden in Medium mit steigenden Oxyharnstoff-Konzentrationen inkubiert.

Wegen der Hemmwirkung bereits geringer Konzentrationen auf die Proliferation der Zellen (Abb. 9) wurden die Mikrokolonien nach Einwirkung des Oxyharnstoff-haltigen Mediums je zweimal mit 1 ml Medium gewaschen, um zu vermeiden, daß durch Spuren von Oxyharnstoff die Hemmung eventueller Reparaturprozesse vorgetäuscht würde. Die Inhibitor-freien Kontrollen wurden in gleicher Weise behandelt.

Wie aus Abbildung 14 zu ersehen ist, bewirkt Oxyharnstoff bereits nach 24-stündiger Einwirkung eine eindeutige Hemmung der Kolonieformfähigkeit der Zellen. Durch zunehmende Konzentrationen wird die Hemmwirkung nicht erheblich gesteigert, wie aus dem flachen Verlauf der Kurve im Bereich von 6 - 20 mM/l Oxyharnstoff zu ersehen ist.

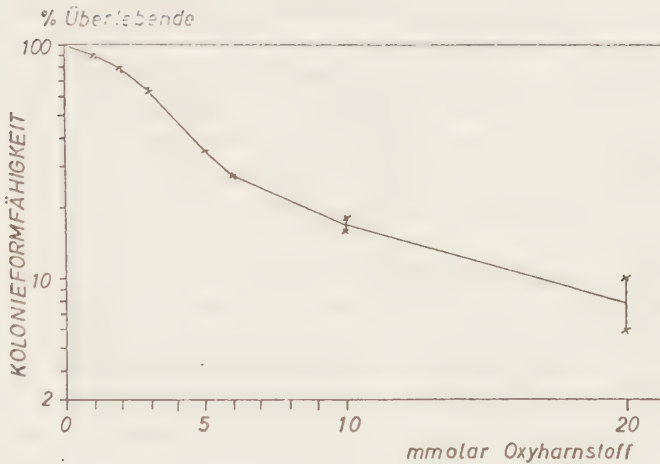


Abb. 14: Prozent Überlebende als Funktion der Oxyharnstoff-Konzentration in der H. Ep. 2 - Zellen für 24 Stunden inkubiert wurden.

Die Zellen wurden nach 24-stündiger Vorinkubation in Inhibitor-freiem Medium 24 Stunden lang in Medium mit steigender Oxyharnstoff-Konzentration und anschließend bis zur Ausbildung zählbarer Kolonien (10 Tage) in Inhibitor-freiem Medium inkubiert.

c. Nachweis einer Reparatur von UV-Schäden

Die bereits bei der Untersuchung der Zellproliferation gefundene Hemmung UV-bestrahlter Zellen durch Coffein führte dazu, daß die Kolonieformfähigkeit UV-bestrahlter Zellen sowohl nach permanenter als auch nach 24-stündiger Inkubation in Coffein-haltigem Medium untersucht wurde. Es sollte klargestellt werden, ob Coffein in den UV-bestrahlten Zellen nur einen zusätzlichen Schaden hervorruft oder ob die Hemmung auf die Unterbindung eines Reparaturprozesses zurückzuführen ist.

Zur Untersuchung der Kolonieformfähigkeit nach UV-Bestrahlung wurden H. Ep. 2 - Zellen in Konzentrationen von 2×10^2 - 1×10^4 Zellen pro Petrischale (4,5 cm Durchmesser) eingesät und 24 Stunden lang inkubiert. Zum Bestrahlen wurde das Medium abgesaugt und unmittelbar nach der Bestrahlung durch frisches Medium ersetzt, dem die angegebenen Coffein-Konzentrationen zugesetzt wurden.

Jede Kurve stellt die Mittelwerte von mindestens 3 Proben dar, in der Regel wurden jedoch je Strahlendosis und Inhibitor-Konzentration zweimal 3 Proben mit unterschiedlich hohen Zelleinsaatn bestrahlt. Die aus den unbehandelten Kontrollen erhaltenen Werte wurden gleich 100 % Überlebende gesetzt.

In Abbildung 15 ist in Kurve A die Wirkung von UV-Strahlung auf die Kolonieformfähigkeit von H. Ep. 2 - Zellen wiedergegeben. Die Kurven C - E geben die Hemmwirkung von Coffein in steigenden Konzentrationen wieder, während Kurve B die Kolonieformfähigkeit UV-bestrahlter H. Ep. 2 - Zellen beschreibt, die vor der Coffein-Einwirkung 24 Stunden lang in Inhibitor-freiem Medium inkubiert wurden.

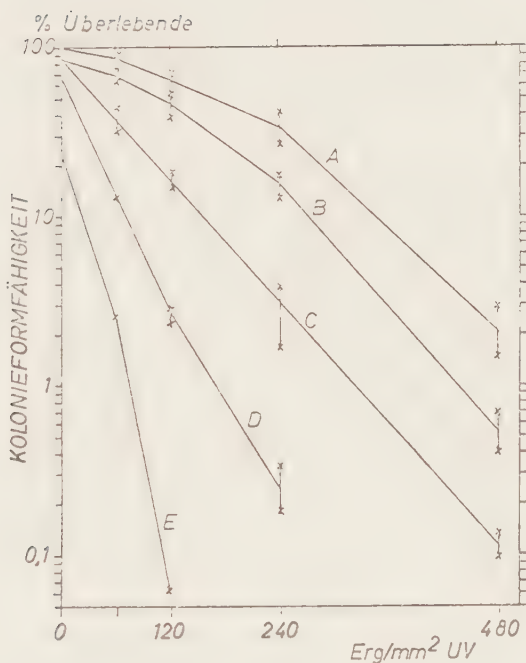


Abb. 15: Prozent Überlebende als Funktion der eingestrahnten UV-Dosis.

H. Ep 2 - Zellen wurden 24 Stunden nach der Einsaat mit steigenden UV-Dosen bestrahlt und anschließend bis zur Ausbildung zählbarer Kolonien in Coffein-haltigem Medium inkubiert (12 Tage).

A = nur UV

B = UV + 1 mM/l Coffein nach 24-stündiger Vorinkubation der Zellen in Inhibitor-freiem Medium

C = 1 mM/l Coffein, D = 2 mM/l, E = 3 mM/l Coffein unmittelbar nach der Bestrahlung

Abbildung 15 zeigt, daß Coffein unmittelbar nach UV-Bestrahlung eine Hemmwirkung auf die Kolonieformfähigkeit bewirkt, während UV-bestrahlte H. Ep. 2 - Zellen durch Coffein in weit geringerem Ausmaß angegriffen werden, wenn der Coffeinzusatz zum Medium erst 24 Stunden nach der Bestrahlung erfolgt.

Bei der Untersuchung der 24-stündigen Einwirkung von Coffein auf UV-bestrahlte H. Ep. 2 - Zellen (Abb. 16) ergab sich ein ähnlicher Verlauf der Dosis-Effekt-Kurve wie nach permanenter Inkubation der Zellen in Coffein-haltigem Medium: Nach Zusatz von 1 - 3 mM/l Coffein zum Inkubationsmedium wurde die Kolonieformfähigkeit gegenüber der Inhibitor-freien Kontrolle stark gehemmt. Eine 24 Stündige Inkubation der UV-bestrahlten Zellen in Inhibitor-freiem Medium bewirkte, daß die Zellen durch anschließende 24-stündige Inkubation in Coffein-haltigem Medium in den Konzentrationen von 1 - 2 mM/l nicht nachweisbar und nach Zusatz von 3 mM/l Coffein nur geringfügig gehemmt werden.

Da diese Ergebnisse darauf hindeuten, daß Coffein den Ablauf eines Reparaturprozesses hemmt, wurde der zeitliche Ablauf des Prozesses untersucht, der zur Aufhebung der Hemmwirkung des Coffeins in UV-bestrahlten Zellen führt. Hierzu wurden die Zellen ausschließlich mit einer Dosis von 240 Erg/mm^2 bestrahlt und unmittelbar nach der Bestrahlung sowie nach verschiedenen langen Inkubationszeiten in Inhibitor-freiem Medium für 24 Stunden in Coffein-haltigem Medium (3 mM/l) inkubiert. Die weitere Inkubation bis zur Ausbildung zählbarer Kolonien erfolgte in Inhibitor-freiem Medium.

Wie aus Abbildung 17 zu ersehen ist, nimmt die Hemmwirkung des Coffeins in einem Zeitraum von 24 Stunden annähernd gleichmäßig ab.

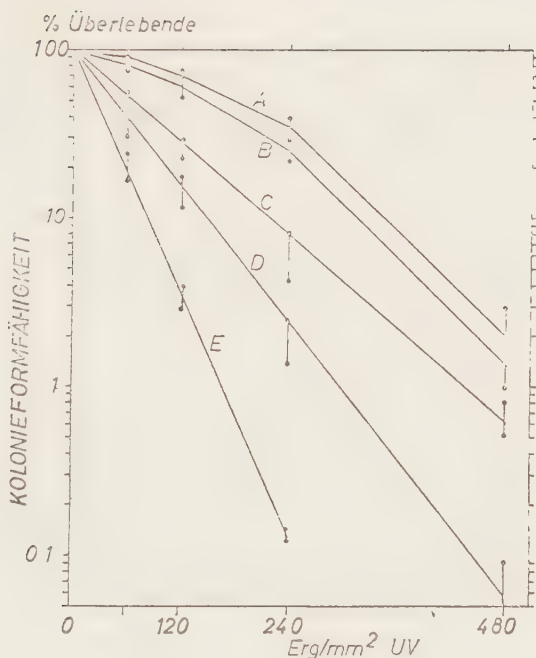


Abb. 16: Prozent Überlebende als Funktion der eingestrahlten UV-Dosis bei 24-stündiger Einwirkung unterschiedlicher Coffein-Konzentrationen. A = nur UV, B = UV + 3 mM/l Coffein nach 24-stündiger Vorinkubation in Inhibitor-freiem Medium, C = UV + 1 mM/l, D = UV + 2 mM/l, E = UV + 3 mM/l Coffein unmittelbar nach der Bestrahlung.

Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Einsaat bestrahlt und unmittelbar nach der Bestrahlung für 24 Stunden in Coffein-haltigem Medium inkubiert. Die weitere Inkubation erfolgte in Inhibitor-freiem Medium (12 Tage).

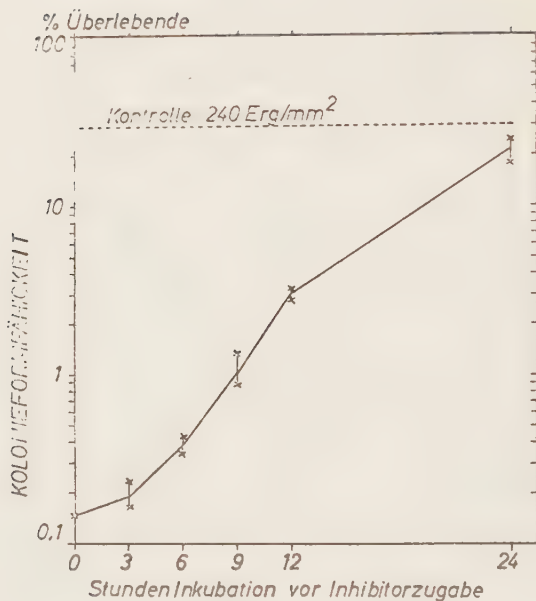


Abb. 17: Abhängigkeit der Kolonieformfähigkeit UV-be-strahlter H. Ep. 2 - Zellen von der Inkuba-tionszeit in Inhibitor-freiem Medium vor Cof-fein-Zugabe.

Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Einsaat mit 240 Erg/mm^2 UV bestrahlt und unmittelbar nach der Bestrahlung sowie nach den angegebenen Vorinkubationszeiten für 24 Stunden in 3 mM/l Coffein-haltigem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bis zur Ausbildung zählbarer Kolonien in Inhibitor-freiem Medium inkubiert. Die gestrichelte Linie gibt die Kolonieformfähigkeit UV-bestrahlter Zellen (240 Erg/mm^2) in Inhibitor-freiem Medium wieder.

d. Wirkung von Oxyharnstoff auf UV-bestrahlte H. Ep. 2 - Zellen

Die Untersuchung der Wirkung von Oxyharnstoff auf UV-bestrahlte Zellen wurde parallel zur Untersuchung der Coffeinwirkung unter Beibehaltung der Versuchsanordnung durchgeführt.

In Abbildung 18 (Kurven B - C) ist die 24-stündige Einwirkung von Oxyharnstoff in steigenden Konzentrationen (1 - 3 mM/l) auf UV-bestrahlte H. Ep. 2 - Zellen wieder gegeben.

Parallel hierzu wurden die Zellen ebenfalls nach der Bestrahlung 24 Stunden lang in Inhibitor-freiem Medium und anschließend für 24 Stunden in Oxyharnstoff-haltigem Medium inkubiert. Wie aus Kurve B (Abb. 18) zu ersehen ist, wird die Hemmwirkung von Oxyharnstoff durch 24-stündige Inkubation UV-bestrahlter Zellen zwar teilweise aufgehoben, die Kolonieformfähigkeit wird jedoch weiterhin stärker gehemmt als die Inhibitor-freie Kontrolle.

Daß die Hemmwirkung von Oxyharnstoff nur teilweise aufgehoben wird, zeigt sich auch in Abbildung 19, die die zeitliche Abnahme der Hemmwirkung von Oxyharnstoff (2 mM/l) auf UV-bestrahlte Zellen wiedergibt.

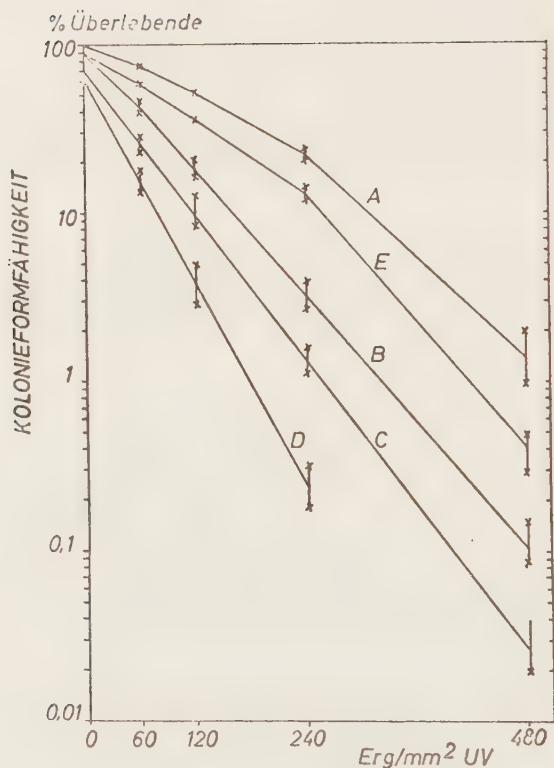


Abb. 18: Prozent Überlebende als Funktion der eingestrahlichten UV-Dosis bei 24-stündiger Einwirkung unterschiedlicher Oxyharnstoff-Konzentrationen. A = nur UV, B = 1 mM/l, C = 2 mM/l, D = 3 mM/l Oxyharnstoff unmittelbar nach der Bestrahlung, E = 1 mM/l Oxyharnstoff nach 24-stündiger Vorinkubation in Inhibitor-freiem Medium. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Einsaat bestrahlt und für 24 Stunden in Oxyharnstoffhaltigem Medium inkubiert. Die weitere Inkubation erfolgte in Inhibitor-freiem Medium (12 Tage).

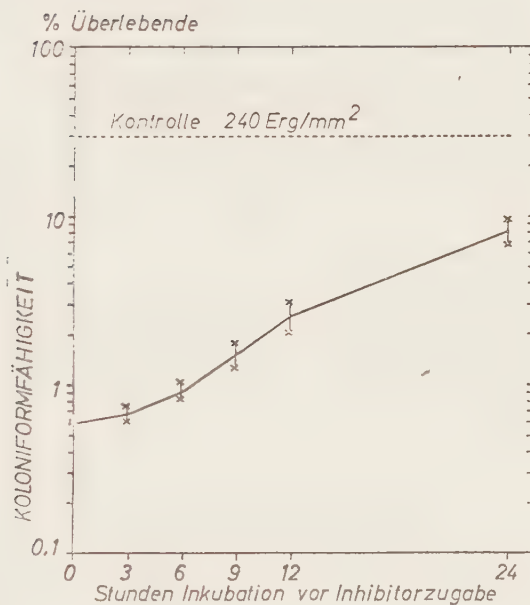


Abb. 19: Abhängigkeit der Kolonieformfähigkeit UV-be-strahlter H. Ep. 2 - Zellen von der Inkubationszeit in Inhibitor-freiem Medium vor Oxyharnstoff-zugabe.

Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Einsaat mit 240 Erg/mm^2 UV bestrahlt und unmittelbar nach der Bestrahlung sowie nach den angegebenen Vorinkubationszeiten für 24 Stunden in 2 mM/l Oxyharnstoff-haltigem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bis zur Ausbildung zählbarer Kolonien in Inhibitor-freiem Medium inkubiert.

Die gestrichelte Linie gibt die Kolonieformfähigkeit UV-bestrahlter Zellen (240 Erg/mm^2) in Inhibitor-freiem Medium wieder.

e. Nachweis einer Reparatur von Röntgenschäden

Zur Untersuchung der Wirkung von Röntgenstrahlen auf H. Ep. 2 - Zellen sowie zum Nachweis möglicher Reparatur-Mechanismen wurden die Zellen 24 Stunden nach der Einsaat mit steigenden Röntgendosen bestrahlt und anschließend in Inhibitor-freiem und Coffein-haltigem Medium inkubiert. Die Dauer der Inkubation in Coffein-haltigem Medium betrug sowohl 24 Stunden als auch 12 Tage.

Bei der 24-stündigen Inkubation in Coffein-haltigem Medium in den Konzentrationen 1 - 3 mM/l konnte keine Wirkung auf röntgenbestrahlte H. Ep. 2 - Zellen nachgewiesen werden (Tabelle 4).

Röntgen-Dosis (rad)	Coffein-Konzentration (mM/l)			
	0	1	3	
0	100	100	100	% Überlebende
50	95	96	74	
100	81	78	72	
200	46	43	38	
300	17	19	15	
400	5	4,4	3,9	
600	0,26	0,17	0,19	

Tab. 4: 24-stündige Einwirkung von Coffein auf röntgenbestrahlte H. Ep. 2 - Zellen.

Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Einsaat mit steigenden Röntgendosen bestrahlt und anschließend für 24 Stunden in Coffein-haltigem Medium (1 u.3 mM/l) inkubiert. Die weitere Inkubation erfolgte bis zur Ausbildung zählbarer Kolonien in Inhibitor-freiem Medium. Die angegebenen Werte (% Überlebende) stellen die Mittelwerte aus zwei Versuchen mit jeweils 3 Proben je Dosis und Coffeinkonzentration dar.

In Abbildung 1b ist die Wirkung von Coffein auf mit steigenden Röntgendosen bestrahlte Zellen wiedergegeben: Bei permanenter Inkubation in Coffein-haltigem Medium (2 mM/l) wurde eine Parallelverschiebung der Kurve gefunden, die der Hemmwirkung von Coffein auf unbestrahlte Zellen entspricht. Eine durch die Bestrahlung hervorgerufene Verstärkung der Hemmwirkung des Coffeins konnte nicht nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung der Wirkung von Oxyharnstoff auf Röntgen-bestrahlte H. Ep. 2 - Zellen wurde die Methodik wie nach UV-Bestrahlung beibehalten: Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Einsaat mit steigenden Röntgendosen bestrahlt und unmittelbar nach der Bestrahlung für 24 Stunden in Oxyharnstoff-haltigem Medium (2 mM/l) inkubiert. Die weitere Inkubation erfolgte bis zur Ausbildung zählbarer Kolonien in Inhibitor-freiem Medium.

Wie aus Abbildung 21 zu ersehen ist, werden Röntgen-bestrahlte H. Ep. 2 - Zellen durch 24-stündige Einwirkung von Oxyharnstoff in einer Weise gehemmt, die der Hemmung UV-bestrahlter Zellen durch Coffein und Oxyharnstoff entspricht.

Aus diesem Grunde wurde untersucht, ob die Empfindlichkeit Röntgen-bestrahlter H. Ep. 2 - Zellen gegenüber Oxyharnstoff durch Vorinkubation der bestrahlten Zellen in Inhibitor-freiem Medium aufgehoben wird.

Hierzu wurden die Zellen 24 Stunden nach der Einsaat mit einer Röntgendosis von 300 rad bestrahlt und unmittelbar nach der Bestrahlung sowie nach verschiedenen langen Inkubationszeiten in Inhibitor-freiem Medium für 24 Stunden in Oxyharnstoff-haltigem Medium (2mM/l) inkubiert. Wie aus Abbildung 22 zu ersehen ist, wird die Hemmwirkung des Oxyharnstoffs auf Röntgen-bestrahlte H. Ep. 2 - Zellen bereits nach 12 Stunden weitgehend aufgehoben.

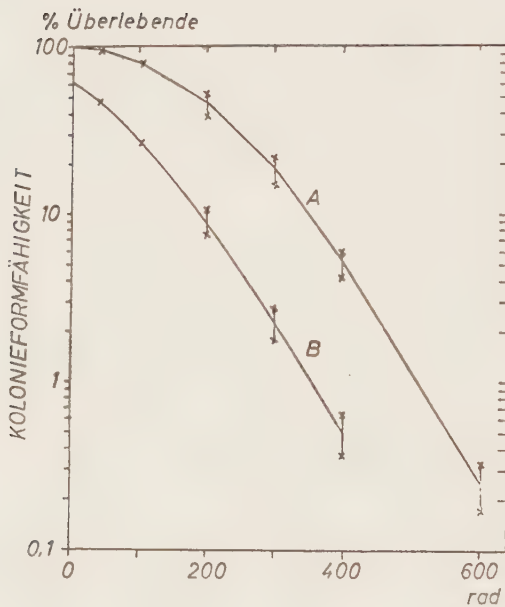


Abb. 20: Prozent Überlebende als Funktion der eingestrahlten Röntgendosis.

Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Einsaat mit den angegebenen Röntgendosen bestrahlt und anschließend in Inhibitor-freiem (A) sowie Coffein-haltigem Medium (2 mM/l) (B) bis zur Ausbildung zählbarer Kolonien inkubiert. Die unbestrahlte Inhibitor-freie Kontrolle wurde gleich 100 % Überlebende gesetzt.

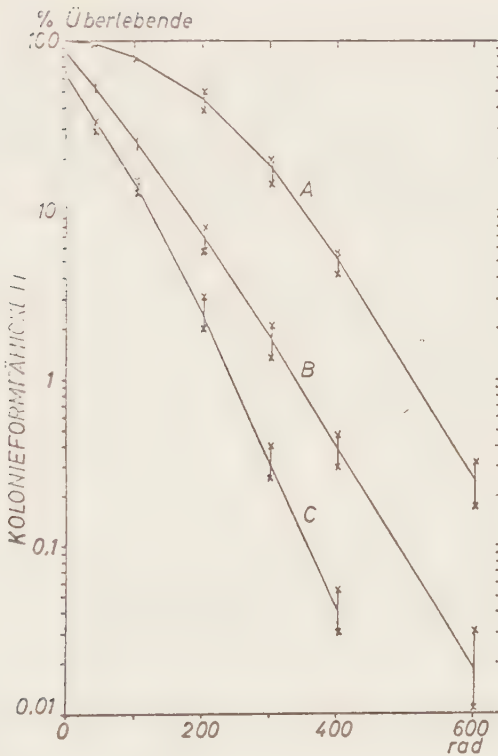


Abb. 21: Prozent Überlebende als Funktion der eingestrahlten Röntgendosis bei 24-stündiger Einwirkung von Oxyharnstoff.

Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Einsaat mit steigenden Röntgendosen bestrahlt und anschließend in Inhibitor-freiem bzw. für 24 Stunden in Oxyharnstoff-haltigem Medium inkubiert.

A = nur Röntgen

B = Röntgen + 1 mM/l Oxyharnstoff für 24 Stunden

C = Röntgen + 2 mM/l Oxyharnstoff für 24 Stunden

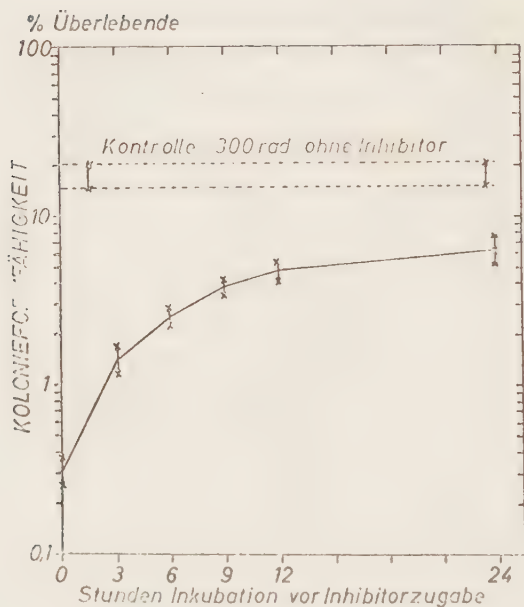


Abb. 22: Abhängigkeit der Kolonieformfähigkeit röntgenbestrahlter H. Ep. 2 - Zellen von der Inkubationszeit in Inhibitor-freiem Medium vor Oxyharnstoffzugabe.

Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Einsaat mit 300 rad Röntgen bestrahlt und unmittelbar nach der Bestrahlung sowie nach den angegebenen Vorinkubationszeiten für 24 Stunden in 2 mM/l Oxyharnstoff-haltigem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bis zur Ausbildung zählbarer Kolonien in Inhibitor-freiem Medium inkubiert.

Die gestrichelte Linie gibt die Kolonieformfähigkeit röntgenbestrahlter Zellen (300 rad) in Inhibitor-freiem Medium wieder.

IV . Biochemischer Nachweis von Reparaturprozessen

Die Abnahme der Empfindlichkeit UV-bestrahlter Zellen gegen Coffein und Oxyharnstoff sowie die Abnahme der Empfindlichkeit Röntgen-bestrahlter Zellen gegen Oxyharnstoff nach Inkubation lassen den Schluß zu, daß in H. Ep. 2 - Zellen eine Reparatur von Strahlenschäden stattfindet.

Aus der unterschiedlichen zeitlichen Abnahme der Empfindlichkeit UV- und Röntgen-bestrahlter Zellen gegenüber Oxyharnstoff sowie der Unempfindlichkeit Röntgen-bestrahlter H. Ep. 2 - Zellen gegenüber Coffein kann ferner geschlossen werden, daß eine mögliche Reparatur von UV- und Röntgenschieden auf unterschiedlichen Mechanismen beruht.

Aus diesem Grunde wurde versucht, mit biochemischen Methoden die erzielten Ergebnisse zu bestätigen. Hierzu wurden 1. die Induktion und Eliminierung von Dimerem Thymin in den Zellen, 2. die Wirkung von UV- und Röntgen-Bestrahlung auf die DNS-Synthese der Zellen und 3. der strahlenbedingte Abbau der DNS untersucht. Gleichzeitig wurde der Einfluß von Coffein und Oxyharnstoff auf alle drei Prozesse untersucht.

1. Aufbereitung des Trifluoressigsäure-Hydrolysats zur Papierchromatographie

Durch die Hydrolyse in Trifluoressigsäure wird aus dem Zellmaterial eine harzige Substanz gebildet, die bei der Papierchromatographie ein quantitatives Abfließen des Thymins und der Pyrimidin-Dimere verhindert. Um den Anteil der harzigen Produkte möglichst gering zu halten, wurden vor der Hydrolyse verschiedene Methoden der DNS-Gewinnung angewendet (168 - 170). Das führte nur dann

zum Erfolg, wenn die isolierte DNS mehrfach gefällt wurde. Diese Methode erwies sich als sehr zeitraubend und schlecht reproduzierbar.

Aus diesem Grund sollte ein Weg gefunden werden, aus dem Hydrolysat der Zellen säulenchromatographisch den radioaktiv markierten Pyrimidinanteil abzutrennen.

Hierzu wurden größere Mengen Zellen in der üblichen Weise mit Trifluoressigsäure hydrolysiert, das Hydrolysat zur Trockene eingedampft, wieder in Wasser aufgenommen und mit einem Gemisch aus ^{14}C -markiertem Thymin und Thymin-Dimeren versetzt.

Es wurden jeweils gleiche Anteile Hydrolysaat auf folgende Säulen gegeben und mit Wasser eluiert:

1. Al_2O_3 neutral "Woelm"
2. Al_2O_3 sauer "Woelm"
3. Al_2O_3 basisch "Woelm"
4. Sephadex G 50
5. Dowex 50 W
6. Amberlite IRC 50

Das Wassereluat wurde in Fraktionen von jeweils 1 ml aufgefangen und hiervon dreimal 0,1 ml mit einer Blutzuckerpipette auf glattes Filtrierpapier als Fleck von ca. 2 cm Durchmesser aufgetragen und die Aktivität mit dem Dünnschicht-Scanner gemessen.

Der Harzanteil wurde durch Bestimmen der am stärksten gefärbten Fraktion ermittelt, was visuell möglich war.

Bei den Säulen 1 - 5 fand nur eine sehr geringe Auftrennung statt, meist lagen Farb- und Aktivitätsmaximum nur 2 - 3 Fraktionen auseinander.

Bei der Amberlite IRC 50 - Säule dagegen blieb der Hauptanteil des gelb gefärbten Harzanteils auf der Säule, während der Pyrimidin-Dimeren-Anteil und der Thymin-Anteil quantitativ mit 25 ml Wasser eluiert wurden. Durch weiteres Eluieren der Säule mit 35 ml Wasser, 20 ml 2n - NH_3 und anschließend mit 30 ml 1 % HCl wurden nur noch 0,35 % der Gesamtaktivität freigesetzt. Die papierchromatographische Analyse der einzelnen Fraktionen des Eluats der Amberlite-IRC 50 - Säule ergab, daß zuerst der Dimeren-Anteil und dann der Thymin-Anteil eluiert wurden. Eine quantitative Auftrennung in Dimeren- und Monomeren-Anteil erwies sich als nicht möglich.

2. Nachweis der Eliminierung UV-induzierter Pyrimidin-Dimere

In Abbildung 23 sowie in Tabelle 5 ist die Abhängigkeit der Dimerenbildung von der eingestrahlten UV-Dosis wiedergegeben.

Für die Untersuchung einer eventuellen Eliminierung der Pyrimidin-Dimeren (Thymin-Dimer und Uracil-Thymin-Misch-Dimer aus Cytosin-Thymin-Dimer (CT)) wurde eine Dosis von 5000 Erg/mm^2 eingestrahlt, da sich bei niedrigeren Dosen der Nachweis der UV-induzierten Pyrimidin-Dimere wegen der verhältnismäßig hohen unspezifischen Aktivität in der Dimeren-Region der unbestrahlten Kontrollen als schwierig erwies (Abb. 25 a, b).

Bei jeder Versuchsanordnung wurde eine unbestrahlte Kontrolle mit aufgearbeitet.

Das Ausmaß der Dimeren-Eliminierung nach 3 und 24 Stunden Inkubation in Inhibitor-freiem sowie Coffein- und Oxy-

harnstoff-haltigem Medium ist in den Tabellen 6 - 8 wiedergegeben. Die Einwirkung von Coffein (5 mM/l) und Oxyharnstoff (3 mM/l) wurde nur in zwei Versuchsansätzen nach 24-stündiger Inkubation untersucht (Tab. 6, 7).

Wie aus den Tabellen 6 - 8 und aus der Abbildung 24 zu ersehen ist, findet bereits nach 3-stündiger Inkubation der Zellen eine Eliminierung der Pyrimidin-Dimeren statt. Durch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 Stunden nimmt der Anteil der eliminierten Pyrimidin-Dimeren jedoch nur noch geringfügig zu. Coffein und Oxyharnstoff zeigten keinen Einfluß auf die Eliminierungsrate der Pyrimidin-Dimeren.

Die Untersuchung der säurelöslichen Fraktionen der Zellen führte bei der chromatographischen Auftrennung zu keinem signifikanten Nachweis von Pyrimidin-Dimeren (Abb. 25 e).

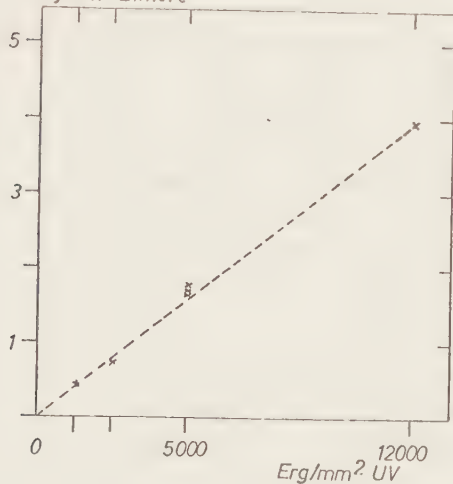
In Tabelle 9 ist das Ausmaß der Eliminierung in latent bakteriell infizierten Zellen wiedergegeben. Die für diesen Versuch verwendete Kultur war mit einem Keim der Pseudomonas-Gruppe⁺ infiziert, auf dessen weitere Spezifizierung verzichtet wurde. Die Infektion der Zellen wurde erst während der Aufarbeitung der Zellen in parallelen Kontrollen gefunden. Die Keime befanden sich sowohl in den Zellen als auch im Inkubationsmedium. Obwohl sich der Keim als Penicillin- und Carbenicillin (Anabactyl^R) - empfindlich erwies, konnte er nicht durch Zusatz von 2000 i. E./ml Penicillin und 2 mg/ml Anabactyl zum Medium aus den Zellen eliminiert werden.

⁺) Ich danke Herrn Prof. Lenk und Frl. Brandt, Inst. für Hygiene und med. Mikrobiologie für die Unterstützung bei der Identifizierung des Keims.

1250	2500	5000	12000	Erg./mm ² UV
0,37	0,74	1,87	3,92	% TT + UT nach Abzug der Aktivität in der Dimeren-Region der un- bestrahlten Kontrolle.
0,44	0,82	1,93	3,90	
0,48	0,60	1,88	4,01	
0,50	0,60	1,70	3,91	
0,37	0,68	1,71	4,03	
0,39	0,79	1,65	3,83	
0,47	0,71	1,69	4,00	
0,50	0,65	1,79	3,92	
0,36	0,63	1,65	3,96	
0,42	0,71	1,77	4,02	
0,47	0,74	1,89	4,00	Summe
0,48	0,81	1,66	4,11	
5,25	8,54	21,25	47,63	Mittelwert
0,44	0,71	1,77	3,97	
± 0,05	± 0,06	± 0,11	± 0,07	Standardabw. der Meß- werte eines Versuchs

Tab. 5 und Abb. 23:

% Thymin-Dimere



Induktion von Thymin-Dimeren nach steigenden UV-Dosen.

Die angegebenen Werte resultieren aus 12 Messungen jeder Probe und geben den Anteil der Thymin- und Uracil-Thymin-Dimere als Prozent der Gesamtkativität wieder. Die in der unbestrahlten Kontrolle in der Dimeren-Region gemessene Radioaktivität wurde von den einzelnen Meßwerten abgezogen.

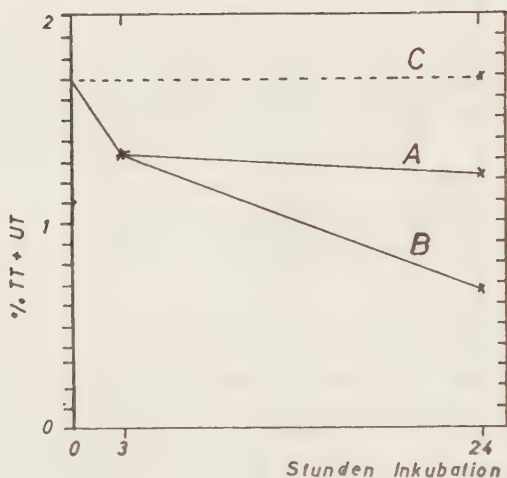


Abb. 24: Abnahme UV-induzierter Pyrimidin-Dimere aus der säureunlöslichen Fraktion der Zellen nach 3 und 24 Stunden Inkubation:

H. Ep. 2 - Zellen wurden nach 24-stündiger Markierung in 2 $\mu\text{Ci/ml}$ $^3\text{H-TdR}$ -haltigem Medium mit einer UV-Dosis von 5000 Erg/mm^2 UV bestrahlt und unmittelbar nach der Bestrahlung sowie nach 3- und 24-stündiger Inkubation auf Pyrimidin-Dimere untersucht.

A = H. Ep. 2 - Zellen

B = bakteriell infizierte H. Ep. 2 - Zellen

C = bakteriell infizierte H. Ep. 2 - Zellen, die nach der Bestrahlung für 24 Stunden in Coffein-(5 mmolar) bzw. Oxyharnstoff-(3 mmolar) haltigem Medium inkubiert wurden.

Unbestr. Kontrolle	5000/0	5000/3	5000/24	5000/24 Coffein	5000/24 Oxyharnst.	Erg pro mm ² / Std. Inkubat.
0,63	1,41	2,13	1,8	1,90	1,90	% Radioakti- tät in der Dimeren-Region
0,64	2,54	2,21	1,81	1,97	1,94	
0,64	2,37	2,13	1,97	2,01	1,85	
0,85	2,38	2,00	2,10	1,98	1,86	
0,62	2,30	1,91	1,95	2,02	1,76	
0,64	2,25	1,88	1,89	1,71	1,82	
0,62	2,28	2,00	1,84	2,10	1,94	
0,62	2,38	1,91	1,93	1,83	1,81	
0,63	2,25	2,08	1,77	1,96	2,00	
0,63	2,38	1,99	1,81	1,87	1,96	
0,61	2,47	2,08	2,08	2,10	2,10	
0,61	2,30	1,98	1,99	1,98	2,04	
7,60	28,37	24,38	23,02	23,49	22,18	Summe
0,63	2,36	2,03	1,92	1,96	1,93	Mittelwert
± 0,002	± 0,06	± 0,11	± 0,11	± 0,097	± 0,097	Standardabw. der Einzelmessungen
./.	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	abzügl. Kontr.
	1,73	1,40	1,29	1,33	1,30	% TT + UT
		19	22,5	23	24,8	% Abnahme

Tabelle 6 (Text S.

Unbestr. Kontrolle	5000/0	5000/3	5000/24	5000/24 Coffein	5000/24 Oxyharnst.	Erg pro mm ² / Std. Inkubat.
0,80	2,32	1,98	2,00	2,12	2,33	% Radioakti- vität in der Dimeren-Region
0,79	2,34	2,09	2,04	2,04	2,20	
0,83	2,39	2,12	2,06	2,09	2,15	
0,86	2,46	2,13	2,03	1,88	2,12	
0,81	2,45	2,18	1,99	2,15	2,19	
0,82	2,47	2,17	2,09	1,91	2,06	
0,85	2,46	2,19	2,06	2,08	2,05	
0,82	2,46	2,07	2,11	1,89	2,09	
0,84	2,44	2,14	1,99	2,13	2,04	
0,75	2,54	2,10	1,96	2,12	2,05	
0,77	2,51	2,14	1,99	2,10	2,07	
0,81	2,49	2,12	1,99	2,05	1,95	
9,75	29,33	25,43	24,31	24,56	25,30	Summe
0,81	2,44	2,12	2,03	2,05	2,11	Mittelwert
± 0,031	± 0,062	± 0,056	± 0,047	± 0,098	± 0,098	Standardabw. der Einzelmessungen
./.	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81	abzügl. Kontr.
	1,63	1,31	1,22	1,24	1,30	% TT + UT
		19,5	25	24	20,1	% Abnahme

Tabelle 7

unbestr. Kontrolle	5000/0	5000/3	5000/24	UV-Dosis (Erg/mm ²) Inkubationszeit (Std)
0,66	2,13	1,76	1,79	% Radioaktivität in der Dimeren-Region
0,70	2,36	1,74	1,82	
0,58	2,29	1,98	1,75	
0,55	2,30	1,73	1,85	
0,59	2,30	1,92	1,92	
0,57	2,28	1,97	1,86	
0,62	2,38	1,92	1,81	
0,64	2,38	1,86	1,89	
0,60	2,16	1,93	1,83	
0,61	2,13	1,96	1,93	
0,62	2,27	1,90	1,67	
0,59	2,17	1,95	1,87	
7,33	27,15	22,62	21,99	Summe
0,61	2,26	1,89	1,83	Mittelwert
± 0,04	± 0,093	± 0,091	± 0,073	Standardabw. der 12 Einzelmessungen
./.	0,61	0,61	0,61	abzüglich Kontrolle
	1,65	1,27	1,22	% TT + UT
		23	26	% Abnahme

Tabelle 8

Tabellen 6-8: Abnahme UV-induzierter Pyrimidin-Dimere aus der säureunlöslichen Fraktion von H. Ep. 2 - Zellen.

Die Zellen wurden nach 24-stündiger Markierung mit 2 µCi/ml ³H-TdR mit 5000 Erg/mm² bestrahlt und unmittelbar nach der Bestrahlung, nach 3 und 24 Stunden Inkubation in Inhibitor-freiem Medium sowie nach 24-stündiger Inkubation in 5 mM/l Coffein- bzw. 3 mM/l Oxyharnstoff-haltigem Medium auf Pyrimidin-Dimere untersucht. Die in den Dimeren-Regionen gemessenen Radioaktivitäten sind als Prozent der Gesamtaktivität wiedergegeben, vermindert um die in den unbestrahlten Kontrollen in den Dimeren-Regionen gefundenen Radioaktivitäten. Es sind jeweils 12 Messungen einer Probe wiedergegeben. Die Standardabweichungen der Radioaktivitätsmessungen wurde nach der auf Seite 64 angegebenen Formel berechnet.

unbestr. Kontrolle	5000/0	5000/3	5000/24	5000/24 Coffein	5000/24 Oxyharnst.	Erg pro mm ² Std. Inkub.
0,83	2,69	2,21	1,67	2,81	2,64	% Radioakti- vität in der Dimeren-Region
0,91	2,61	2,34	1,80	2,58	2,78	
0,90	2,94	2,41	1,90	2,88	2,71	
0,93	2,74	2,46	1,50	2,75	2,80	
0,94	2,80	2,52	1,70	2,70	2,85	
0,98	2,81	2,43	1,77	2,76	2,64	
1,00	2,81	2,55	1,63	2,73	2,84	
1,01	2,87	2,18	1,70	2,70	2,74	
1,03	2,87	2,28	1,62	2,76	2,76	
1,06	2,64	2,10	1,66	2,68	2,75	
1,04	2,62	2,27	1,50	2,73	2,59	
1,03	2,77	2,41	1,55	2,72	2,78	
11,68	32,89	28,04	19,81	32,82	32,78	Summe
Q ₉₅	2,74	2,34	1,65	2,74	2,74	Mittelwert
0,071	0,097	0,123	0,085	0,069	0,097	Standardabw. der Einzelmessungen
...	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	abzügl. Kontr.
	1,76	1,36	0,67	1,76	1,76	% TT + UT
		22,6	62	--	--	% Abnahme

Tab. 9: Abnahme UV-induzierter Pyrimidin-Dimere aus der säureunlöslichen Fraktion bakteriell infizierter H.Ep. 2 - Zellen.

Mit einem Keim der Pseudomonas-Gruppe latent infizierte H. Ep. 2-Zellen wurden nach 24-stündiger Markierung mit 2 $\mu\text{Ci/ml}$ $^3\text{H-TdR}$ mit 5000 Erg/mm² UV bestrahlt und unmittelbar nach der Bestrahlung sowie nach 3 und 24-stündiger Inkubation in Inhibitor-freiem Medium und nach 24-stündiger Inkubation in 5 mM/l Coffein- bzw. 3 mM/l Oxyharnstoff-haltigem Medium auf Pyrimidin-Dimere untersucht. Die in der Dimeren-Region einer mitaufgearbeiteten unbestrahlten Kontrolle gefundene Radioaktivität wurde von den einzelnen Meßwerten abgezogen. Es sind jeweils 12 Messungen einer Probe wiedergegeben. Die Standardabweichung der Radioaktivitätsmessungen wurde nach der auf Seite 64 angegebenen Formel berechnet.

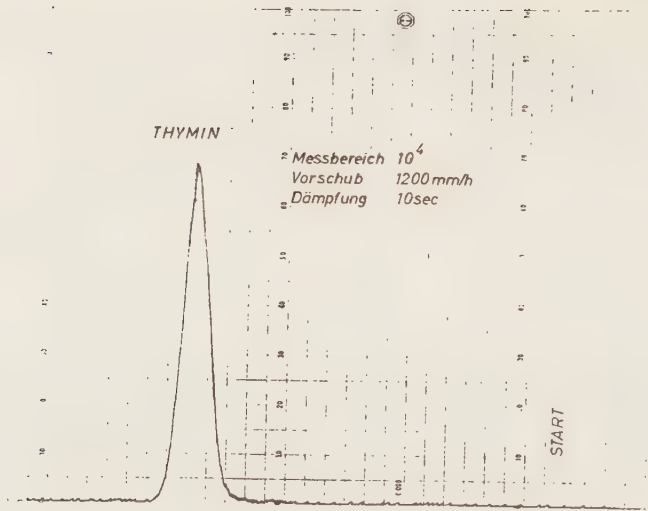


Abbildung 25 a

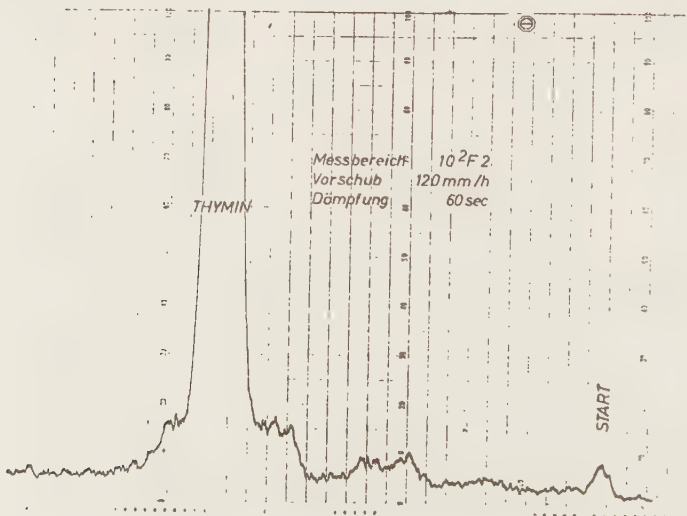


Abbildung 25 b

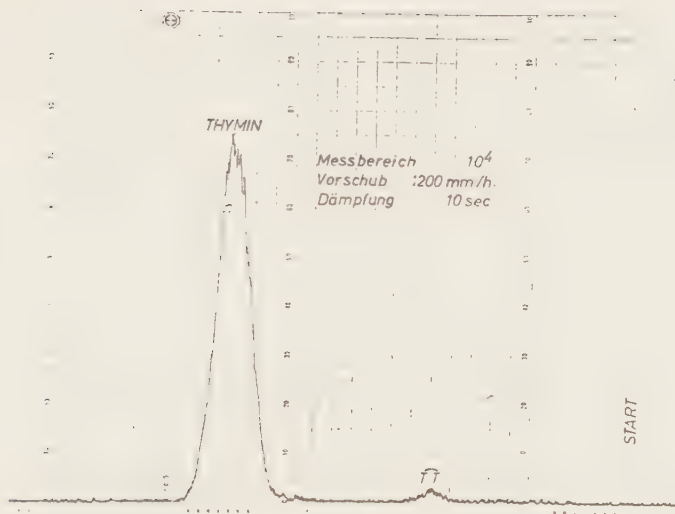


Abbildung 25 c

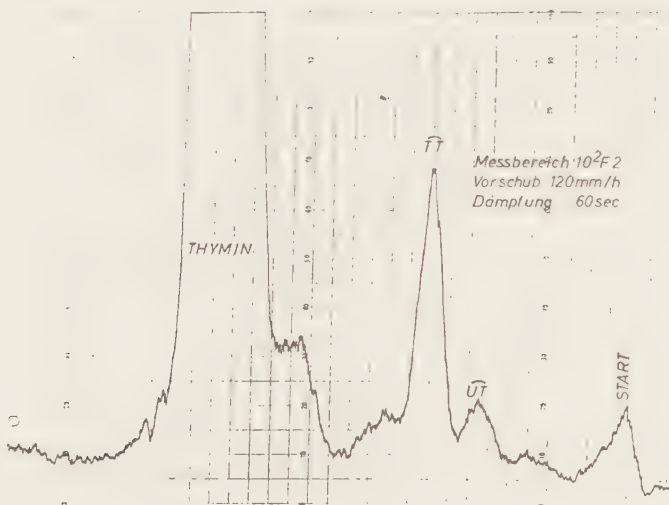


Abbildung 25 d

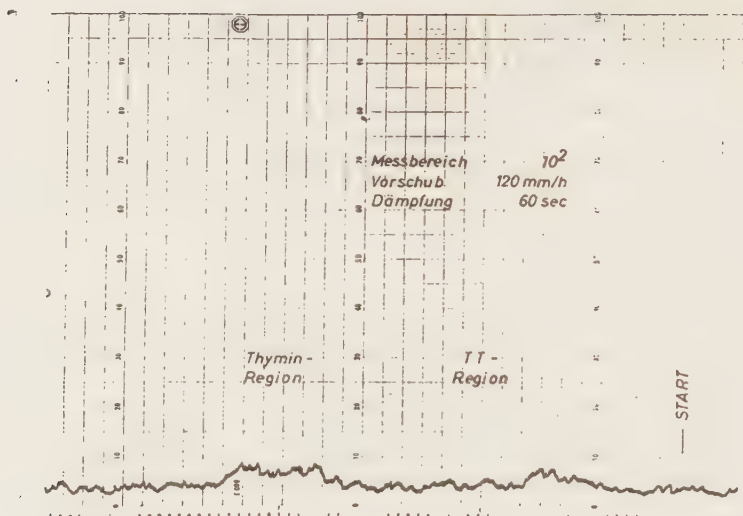


Abbildung 25 e

Abb. 25 a - e: Aufzeichnung der Radioaktivitätsverteilung auf den Chromatogrammen:

H. Ep. 2 - Zellen wurden nach 24-stündiger Markierung mit $2 \mu\text{Ci/ml } ^3\text{H-TdR}$ mit 5000 Erg/mm^2 UV bestrahlt und unmittelbar nach der Bestrahlung sowie nach 3- und 24-stündiger Inkubation mit Trifluoressigsäure hydrolysiert und chromatographisch aufgetrennt.

- 25 a,b = unbestrahlte Kontrolle
- 25 c,d = 5000 Erg/mm^2 ohne Inkubation
- 25 e = säurelösliche Fraktion, 5000 Erg/mm^2 , 24 Stunden Inkubation.

3. Nachweis einer außerplanmäßigen DNS-Synthese

Zur Bestimmung der DNS-Syntheserate nach UV- und Röntgenbestrahlung wurde die Einbaurrate von ^3H -TdR in die säureunlösliche Fraktion der Zellen gemessen. Der Nachweis einer außerplanmäßigen DNS-Synthese (Definition s. S.36) erfolgte durch Messen der Einbaurrate von ^3H -TdR in die Zellen in Gegenwart von Oxyharnstoff.

Zur Untersuchung der strahlenabhängigen DNS-Synthese sowie zum Nachweis einer außerplanmäßigen DNS-Synthese wurden neben unbestrahlten Kontrollen gleiche Anteile einer Zellsuspension in PBS mit steigenden UV- und Röntgendosen bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen in Medium resuspendiert und nochmals in drei gleiche Teile aufgeteilt und nach Zusatz von ^3H -TdR-haltigem Medium zu einer Endkonzentration von 2 $\mu\text{Ci/ml}$ ohne Inhibitor bzw. mit 5 mM/l Coffein oder 3 mM/l Oxyharnstoff für drei Stunden inkubiert.

Im Anschluß an die Inkubation wurden die Zellen wie unter Material und Methodik angegeben aufgearbeitet und die Aktivität in den Zellen gemessen.

In Coffein-haltigem Medium wurde der Einbau von ^3H -TdR in den unbestrahlten Kontrollen sowie nach 240 und 5000 Erg/mm^2 UV- und nach 400 und 5000 rad Röntgenbestrahlung bestimmt. Die Einbaurrate dieser Proben unterschied sich nicht von den entsprechenden Inhibitorfreien Proben (Tabelle 10).

Das Ausmaß der strahlenabhängigen DNS-Synthese sowie der außerplanmäßigen DNS-Synthese nach UV- und Röntgenbestrahlung ist in Abbildung 26 wiedergegeben.

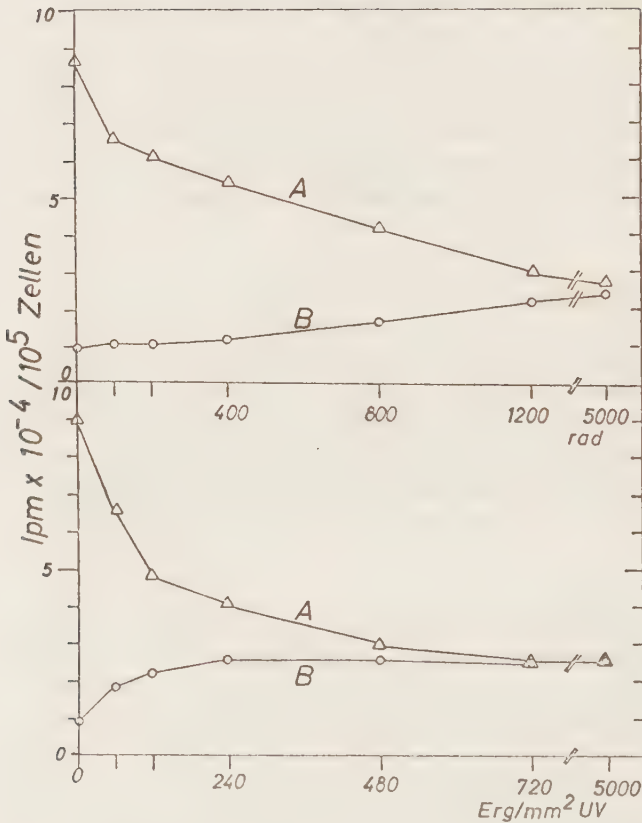


Abb. 26: Abhängigkeit der DNS-Synthese (Einbau von ^3H -TdR in die säureunlösliche Fraktion) nach UV- und Röntgenbestrahlung: H. Ep. 2 - Zellen wurden in Suspension bestrahlt und für 3 Stunden in $2\text{ }\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -TdR-haltigem Medium inkubiert. Zum Nachweis einer außerplanmäßigen DNS-Synthese wurde einem Teil der Proben 3 mM/l Oxyharnstoff zugesetzt. A = Einbaurrate in Inhibitor-freiem Medium B = Einbaurrate in 3 mM/l Oxyharnstoff-haltigem Medium (= außerplanmäßige DNS-Synthese).

Die aufgezeigten Ergebnisse resultieren aus zwei unabhängigen Versuchsansätzen und stellen die Mittelwerte aus jeweils 6 Messungen je Probe dar.

Inhibitor	Kontr.	Erg/mm ² UV		rad Röntgen		
		240	5000	400	5000	
ohne Inh.	8,8	6,7	2,6	5,6	2,7	IpM x 10 ⁻⁴ / 10 ⁵ Zellen
Coffein (5 mM/l)	8,4	6,5	2,6	5,7	2,8	

Tabelle 10: DNS-Syntheserate UV- und Röntgen-bestrahlter H. Ep. 2 - Zellen in Gegenwart von Coffein

H. Ep. 2 - Zellen wurden in Suspension mit den angegebenen UV- und Röntgen-Dosen bestrahlt und für 3 Stunden in Inhibitor-freiem sowie Coffein-haltigem Medium (5 mM/l) inkubiert, dem 2 µCi/ml ³H-TdR zugesetzt wurden. Die DNS-Syntheserate wurde als Einbau von ³H-TdR in die saureunlösliche Fraktion der Zellen bestimmt. Die angegebenen Werte wurden in zwei Versuchen ermittelt und jeweils als Impulse pro 10⁵ Zellen berechnet.

4. Bestimmung des DNS-Abbaus nach UV- und Röntgenbestrahlung

Zur Bestimmung des DNS-Abbaus nach UV- und Röntgenbestrahlung wurden die Zellen 24 Stunden lang in ^3H -TdR-haltigem Medium (2 $\mu\text{Ci/ml}$) und anschließend eine Stunde lang in inaktivem Medium inkubiert. Die Inkubation in inaktivem Medium erfolgte, um eine Ansammlung von ^3H -TdR und aktiven DNS-Vorstufen in der säurelöslichen Fraktion zu vermeiden. Zur Bestrahlung sowie zur Ermittlung der in die unbestrahlte Kontrolle eingebauten Aktivität wurden die Zellen durch Trypsinbehandlung suspendiert und in gleiche Fraktionen aufgeteilt. Für die UV-Bestrahlung wurden die Zellen in PBS und zur Röntgenbestrahlung in Inkubationsmedium suspendiert. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen in Petrischalen in 5 ml Medium ohne Inhibitor sowie in Gegenwart von 5 mM/l Coffein und 3 mM/l Oxyharnstoff für die angegebenen Zeiten inkubiert.

Das Ausmaß des DNS-Abbaus wurde bestimmt, indem zum einen die Aktivität im Inkubationsmedium und zum anderen die Aktivität in den Zellen wie unter Material und Methodik angegeben gemessen wurde. In Abbildung 27 ist die im Medium gemessene Radioaktivität in Prozent der Gesamtradioaktivität wiedergegeben, die während der 24-stündigen Inkubation in ^3H -TdR-haltigem Medium in die säureunlösliche Fraktion der Zellen eingebaut worden war.

Nach Inkubation der Zellen in Coffein- und Oxyharnstoffhaltigem Medium konnte gegenüber den Inhibitor-freien Proben keine unterschiedliche Abgabe von Aktivität an das Inkubationsmedium nachgewiesen werden. (Tab. 10).

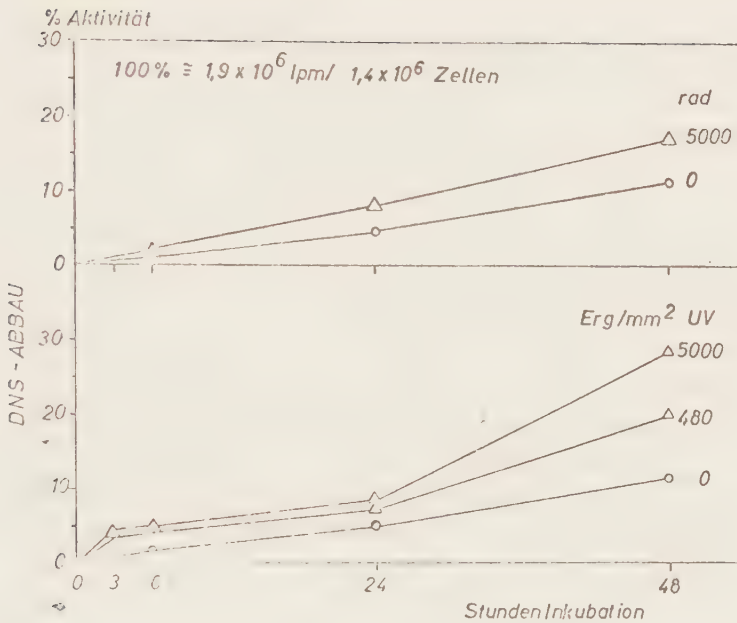


Abb. 27 : Abgabe von Radioaktivität durch ^3H -TdR-markierte H. Ep. 2 - Zellen nach UV- und Röntgenbestrahlung an das Inkubationsmedium.

Für 24 Stunden in $2 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -TdR-haltigem Medium inkubierte Zellen wurden eine Stunde lang in inaktivem Medium inkubiert, anschließend mit den angegebenen UV- und Röntgendosen bestrahlt und für die angegebenen Zeiten in 5 ml Medium inkubiert. Die Aktivität wurde sowohl in den Zellen als auch im Medium gemessen, wobei die Radioaktivität in der säureunlöslichen Fraktion der unbestrahlten Kontrolle gleich 100 % Aktivität gesetzt wurde. In der Abbildung ist die im Medium ermittelte Aktivität als Prozent der Gesamtaktivität wiedergegeben.

Strahlen-Dosis	Inkubationszeit (Stunden)				
	3	6	24	48	
Kontrolle					% der Gesamtkaktivität, die von den Zellen an das Inkubationsmedium abgegeben wurde
O	-	2,1	4,8	10,4	
O C	-	2,2	4,7	-	
O HU	-	2,0	5,1	-	
Erg/mm ² UV					
480	4,1	4,9	7,0	20,4	
480 C	4,2	4,9	7,4	-	
480 HU	4,5	4,6	8,1	-	
5000	4,6	5,1	8,3	29,7	
5000 C	4,4	4,7	9,7	27,6 ⁺	
5000 HU	4,5	4,6	8,1	-	
RAD Röntgen					
5000	-	2,4	7,6	17,8	
5000 C	-	2,7	7,0	-	
5000 HU	-	2,5	8,2	-	

+ = nur eine Messung, C = Coffein, HU = Oxyharnstoff (Hydroxy-urea)

Tabelle: 11

Abgabe von Radioaktivität durch ³H-TdR-markierte H.Ep. 2 - Zellen nach UV- und Röntgenbestrahlung in Gegenwart von Coffein (5mmolar) und Oxyharnstoff (3 mmolar) an das Medium.

Für 24 Stunden in ³H-TdR-haltigem Medium (2 µCi/ml) inkubierte Zellen wurden für eine Stunde in inaktivem Medium inkubiert, mit den angegebenen UV- und Röntgendosen bestrahlt und anschließend für die angegebenen Zeiten in 5 ml Medium mit den angegebenen Inhibitor-Konzentrationen inkubiert. Die Aktivität wurde sowohl im Medium als auch in den Zellen gemessen, wobei die Aktivität in der säure-unlöslichen Fraktion der unbestrahlten Kontrolle gleich 100 % Aktivität gesetzt wurde. In der Tabelle ist die im Medium ermittelte Radioaktivität als Prozent der Gesamtaktivität wiedergegeben.

E. Diskussion

1. Beurteilung der Bezugssysteme

a. Kolonieformfähigkeit

Wie aus Tabelle 2 zu sehen ist, bilden H. Ep. 2 - Zellen unabhängig von der Dichte der Einsaat Kolonien aus. Die Aussagekraft der mit Hilfe der Kolonieformfähigkeit aufgestellten Dosis-Effekt-Kurven wird dadurch deutlich, daß im Bereich der Einsaaten von 70-700 Zellen die prozentuale Kolonieausbildungsrate annähernd gleich ist.

Die Zahl der ausgebildeten Kolonien schwankt im Bereich von 100 - 700 ausgebildeten Kolonien (nur in geringem Maß ($126 \pm 5,6$, 618 ± 20), so daß hierdurch keine Beeinflussung der Dosis-Effekt-Kurven zu erwarten ist. Ferner wurde in Vorversuchen stets die Einsaat ermittelt, die zur Ausbildung von 100 - 200 Kolonien führte. In diesem Bereich waren die Kolonien gleichmäßig in den Petrischalen verteilt und ließen sich gut auszählen.

b. Radioaktivitätsmessung

Die vorliegenden Ergebnisse wurden mit einem Dünnschicht-Chromatogramm - Scanner ermittelt. Zur Messung der Radioaktivitäten bei Untersuchungen über die DNS-Syntheserate und den DNS-Abbau mußte die Meßausbeute bestimmt werden. Die Bestimmung erfolgte nach Berthold und Wenzel (176). Hierzu wurde Inkubationsmedium mit einer Endkonzentration von 10,00 $\mu\text{Ci/ml}$ in einer Verdünnungsreihe nach der unter Material und Methodik angegebenen Methode gemessen. Gleichzeitig wurde die aufgetragene Schichtdicke bestimmt. Die Trockensubstanz im kompletten Medium betrug etwa 14 mg/ml, während die für eine Probe bei der DNS-Synthese-Bestimmung bzw. beim DNS-Abbau aufgearbeiteten Zellmenge etwa 10 mg betrug.

Wie aus Abbildung 28 zu ersehen ist, erfolgten die Messungen dabei in einem Bereich, in dem geringe Abweichungen in der Schichtdicke sich stark auf das Meßergebnis auswirken. Aus diesem Grund wurden die einzelnen Proben in mindestens zwei Verdünnungsstufen gemessen. Gleichzeitig wurde darauf geachtet, daß alle Proben in den gleichen Verdünnungsstufen gemessen wurden.

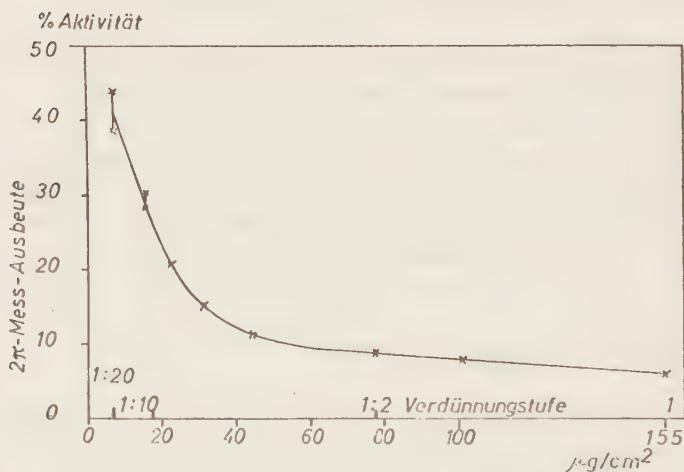


Abb. 28: Abhängigkeit der Meßausbeute mit dem Scanner (2 π -Messung) von der Schichtdicke.
Mit 10 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ^3H -TdR markiertes Medium wurde in einer Verdünnungsreihe ausgemessen. Hierzu wurden jeweils viermal 0,1 ml Medium bzw. verdünntes Medium in Quadraten mit der Kantenlänge 3 cm auf eine Glasplatte aufgetragen und dreimal mit dem Scanner ausgemessen.

c. Statistische Prüfung der Dimeren-Abnahme

Zur Überprüfung, ob der gefundenen Abnahme der UV-induzierten Pyrimidin-Dimeren nach Inkubation der Zellen eine statistische Signifikanz zugesprochen werden kann, wurde der H-Test zum Vergleich mehrerer unabhängiger Stichproben von Kruskal und Wallis (nach Sachs, 187) angewendet.

Hierbei werden die ermittelten Stichproben (k) (% TT + UT nach 5000 Erg/mm² UV ohne Inkubation sowie nach 3 und 24 Stunden Inkubation) zu einem Kollektiv mit dem Umfang n (= 10) vereinigt. Allen Meßwerten werden Ränge R von 1 bis n zugeteilt, wobei dem höchsten Meßwert der Rang 10, dem zweithöchsten Meßwert der Rang 9 usw. zugeordnet wird.

Als Meßwerte wurden die Mittelwerte aus den Tabellen 5 - 8 übernommen.

Die von Kruskal und Wallis definierte Prüfgröße H berechnet sich nach der Formel:

$$H = \left[\frac{12}{n(n+1)} \right] \cdot \left[\sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} \right] - 3(n+1)$$

Hierbei stellen die Zahlen 12 und 3 mathematische Konstanten, n die Anzahl der Meßwerte, n_i die Anzahl der Meßwerte pro Stichprobe, k die Anzahl der Stichproben und R_i die Summe der Ränge R dar.

Zur Berechnung der Signifikanz wurde das folgende Schema aufgestellt:

% TT + UT nach 5000 Erg/mm ² UV					
Ohne Inku- bation		nach 3 Std. Inkubation		nach 24 Std. Inkubation	
% XT	Rang	% XT	Rang	% XT	Rang
1,77	10	1,40	6	1,29	4
1,73	9	1,27	3	1,22	1,5
1,65	8	1,31	5	1,22	1,5
1,63	7				
R _i	34		14		7
R _i ²	1156		196		49
n _i	4		3		3
$\frac{R_i^2}{n_i}$	289		65,3		16,3
$\sum \frac{R_i^2}{n_i} = 370,6$					

$$H = \frac{12}{10 \cdot 11} \cdot 370,6 - 3 (10 + 1) = 7,43$$

Aus der von Kruskal und Wallis angegebenen Tabelle für die Irrtumswahrscheinlichkeit ergibt sich für den Wert 7,43 eine Wahrscheinlichkeit von > 99 %, daß die erzielten Ergebnisse auf einer Abnahme der Thymin-Dimeren als Folge der Inkubation beruhen.

2. Beurteilung der Ergebnisse

a. Eliminierung von Pyrimidin-Dimeren

Es ist nachgewiesen, daß Pyrimidin-Photoprodukte die Hauptursache für die letale Wirkung der UV-Strahlung auf Bakterien darstellen (18).

Ob dies im gleichen Maß für Säugetierzellen zutrifft, ist noch nicht eindeutig geklärt, denn in Zellreihen der Maus und des chinesischen Hamsters konnten keine Eliminierung von Thymin-Dimeren (103, 111, 121 - 124), wohl aber DNS-Synthese-Vorgänge (Einbau von ^3H -TdR) als Folge der Bestrahlung nachgewiesen werden (119,122).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht, 1.) die Eliminierung von Pyrimidin-Dimeren aus H. Ep. 2 - Zellen nachzuweisen und 2.) einen eventuellen Zusammenhang mit anderen strahleninduzierten Prozessen (außerplanmäßige DNS-Synthese, DNS-Abbau, Hemmbarkeit von Reparaturvorgängen durch Coffein und Oxyharnstoff zu untersuchen.

Zum sicheren Nachweis der UV-induzierten Pyrimidin-Dimere nach chromatographischer Auftrennung waren relativ hohe UV-Dosen erforderlich, nach denen eine Überlebensrate der Zellen nicht mehr festgestellt werden konnte und auch nicht zu erwarten war. Hierdurch wird die Aussagekraft möglicherweise beeinträchtigt. Der Nachweis von dimerem Thymin bzw. gemischter Dimere ergab in der angegebenen Methode gut reproduzierbare Werte, wie sowohl aus Tab. 5 und Abb. 23 als auch aus den Tabellen 6 - 8 zu ersehen ist.

Nach einer UV-Dosis von 5000 Erg/mm^2 konnten im Mittel 1,70 % TT + UT nachgewiesen werden. Nach 3 Stunden Inkubation sank der Dimeren-Anteil auf 1,33 % und nach 24 Stunden auf 1,24 % (Mittelwerte). Hieraus ist eine eindeutige Abnahme der Thymin-Dimeren zu erkennen. Auffällig ist, daß die stärkste Eliminierung der Dimeren innerhalb der ersten drei Stunden nach der Bestrahlung erfolgt und somit ein Zusammenhang mit der strahleninduzierten außerplanmäßigen DNS-Synthese (s.u.) zu bestehen scheint.

Versuchsansätze, denen Coffein (5 mmolar) und Oxyharnstoff (3mmolar) zum Inkubationsmedium zugesetzt wurde, zeigen die gleiche Abnahme an Radioaktivität in der Dimeren-Region wie die in normalem Medium inkubierten Zellen. Dies zeigt eine Parallele zum DNS-Abbau auf: Weder Coffein noch Oxyharnstoff hatte einen Einfluß auf die Abgabe von Radioaktivität aus der säureunlöslichen Fraktion der Zellen an das Inkubationsmedium. Aufschlußreich ist auch die hohe Eliminierungsrate der Pyrimidin-Dimeren, die annähernd 25 % erreichte. In Anbetracht der hohen UV-Dosen kann erwartet werden, daß in Zellen, die mit niedrigeren UV-Dosen bestrahlt werden, ein höherer Prozentsatz an Thymin-Dimeren eliminiert wird.

Daß sich das Ausmaß der Dimeren-Eliminierung in Säugerzellen von dem in Bakterien unterscheidet, konnte durch Zufall gezeigt werden: Mit einer latent bakteriell infizierten Zellkultur (mit einem nicht differenzierten Pseudomonas-Bakterium) wurde ein Versuch angesetzt und die Verunreinigung erst während der Aufarbeitung der Zellen in parallelen Kontrollen nachgewiesen. In den infizierten Zellen wurde die Eliminierung von 62 % der UV-induzierten Pyrimidin-Dimeren nachgewiesen,

während Coffein und Oxyharnstoff eine vollständige Hemmung der Eliminierung bewirkten. Obwohl dieser einzelne Versuch nur geringe Aussagekraft hat, zeigt er doch, daß Bakterien andere Reaktionsschritte der Dunkelreparatur vollziehen als Säugetierzellen, da in nicht-infizierten H. Ep. 2-Zellen keine Hemmung der Dimeren-Eliminierung durch Coffein und Oxyharnstoff nachgewiesen werden konnte.

Eine Kontrolluntersuchung der säurelöslichen Fraktionen ergab keine Bestätigung für die Excision von Pyrimidin-Dimeren (Abb. 25 e). Das ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß ein Teil der eliminierten Dimeren von den Zellen an das Inkubationsmedium abgegeben wurde und somit bei der Untersuchung der säurelöslichen Fraktion nicht erfaßt wurde.

Die hier aufgezeigten Ergebnisse der Dimeren-Eliminierung in H. Ep. 2 - Zellen stehen in Einklang mit Ergebnissen von Coyle und Strauss (171). Sie ließen eine für Pyrimidin-Dimere spezifische Endonuclease aus *Micrococcus lysodeikticus* auf die unmittelbar nach der Bestrahlung und nach verschiedenen langen Inkubationszeiten isolierte DNS von H. Ep. 2 - Zellen einwirken. Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation im alkalischen Sucrosegradienten wiesen sie nach, daß die Endonuclease nach längeren Inkubationszeiten einen geringeren Abbau der DNS bewirkte als unmittelbar nach der Bestrahlung. Hieraus wurde geschlossen, daß H. Ep. 2 - Zellen zur Eliminierung von Pyrimidin-Dimeren in der Lage sind und daß die mit der Eliminierung verbundenen Strangbrüche geschlossen werden.

b. DNS-Abbau

Parallel zur Eliminierung der Pyrimidin-Dimeren sollte das Ausmaß des strahleninduzierten DNS-Abbaus unter-

sucht werden. Es galt zu prüfen, ob nach Applikation von 5000 Erg/mm^2 UV-Strahlung eine Lysis der Zellen und eine Zersetzung der DNS stattfindet, aus der die Abnahme der Thymin-Dimeren zu erklären wäre.

Gleichzeitig sollte überprüft werden, ob ein eventueller DNS-Abbau mit der in Bakterien stattfindenden Degradierung der DNS zu vergleichen ist.

In Bakterien werden nach UV- und Röntgenbestrahlung innerhalb der ersten 2 Stunden nach der Bestrahlung bis zu 50 % der DNS abgebaut und durch gleichzeitige Rekombination der eliminierten DNS-Bruchstücke repariert (72).

In H. Ep. 2 - Zellen wurde innerhalb der ersten 3 Stunden nach 5000 Erg/mm^2 UV-Bestrahlung ein Abbau von 4 - 5 % der DNS gefunden, gemessen als Abgabe von Radioaktivität aus der säureunlöslichen Fraktion der Zellen an das Inkubationsmedium. Gleichzeitig wurde auch in den unbestrahlten Kontrollen ein Abbau der DNS gefunden, der allerdings erst nach längerer Inkubation (24 - 48 Stunden) eindeutig nachweisbar war (Abb. 27). ⁽¹⁷³⁾ Claever und Trosko diskutieren die Möglichkeit, daß der DNS-Abbau durch Tod der bestrahlten Zellen und eine dadurch bedingte Lysis der Zellen hervorgerufen wird. Folgende Ergebnisse sprechen jedoch dafür, daß es sich bei dem innerhalb der ersten 3 - 6 Stunden nachgewiesenen DNS-Abbau zumindest teilweise um das selektive Herausschneiden von DNS-Regionen mit UV-Photoprodukten handelt:

1. In UV-bestrahlten Zellen findet innerhalb der ersten drei Stunden nach der Bestrahlung ein stärkerer DNS-Abbau statt als in unbestrahlten Zellen. Das Aus-

maß des DNS-Abbaus nimmt innerhalb der ersten 24 Stunden nur geringfügig zu. Dies spricht gegen eine spontane Lysis abgetöteter Zellen.

2. Parallel zum DNS-Abbau wurde nach 5000 Erg/mm^2 UV-Bestrahlung innerhalb der ersten drei Stunden nach der Bestrahlung der Einbau von $^3\text{H-TdR}$ in Form einer außerplanmäßigen DNS-Synthese nachgewiesen.

3. Die Eliminierung der Pyrimidin-Dimeren wurde vorwiegend innerhalb der ersten drei Stunden nach der Bestrahlung nachgewiesen. Nach 24-stündiger Inkubation wurde im Verhältnis zur Dimeren-Eliminierung ein stärkerer DNS-Abbau nachgewiesen, der auf einer Lysis abgetöteter Zellen beruhen könnte.

Während in UV-bestrahlten Zellen bereits nach 480 Erg/mm^2 ein stärkerer DNS-Abbau festgestellt wurde als in unbestrahlten Zellen, gelang der Nachweis eines DNS-Abbaus in röntgenbestrahlten Zellen erst nach einer Dosis von 5000 rad. Auch nach dieser hohen Dosis war der DNS-Abbau erst nach 24 Stunden eindeutig nachweisbar.

Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen von Dalrymple et al. (174), Painter (175) und Little (172) überein, die ebenfalls nach Röntgenbestrahlung in L-Zellen, He-La-Zellen und menschlichen Amnion-Zellen keinen oder nur einen geringen DNS-Abbau nachweisen konnten. Little (172) diskutiert daher die Möglichkeit, daß die Reparatur von Röntgenschäden nach Excision einzelner Basen und nicht nach Excision größerer DNS-Regionen erfolgt.

Als Ursache für den DNS-Abbau in den unbestrahlten Kontrollen sehen Cleaver und Trosko (173) eine Strahlenwirkung durch den radioaktiven Zerfall des eingebauten Tritiums ($^3\text{H-TdR}$) an. Hiergegen spricht jedoch die ge-

ringe Steigerung des Abbaus durch Röntgenbestrahlung.

Eine weitere mögliche Erklärung wäre, daß der DNS-Abbau in unbestrahlten Zellen Teil einer spontanen außerplanmäßigen DNS-Synthese ist. Djordjevic (177) wies in HeLa-Zellen eine außerplanmäßige DNS-Synthese nach, die ohne erkennbare extracelluläre Stimulierung erfolgte. Diese spontane außerplanmäßige DNS-Synthese wurde als Teil einer Eliminierung von Fehlstellen gedeutet, die bei der Replikation in der DNS entstanden sein könnten.

Coffein (5 mmolar) und Oxyharnstoff (3 mmolar) erwiesen sich als ohne Einfluß auf den strahlenbedingten DNS-Abbau (Tab. 11), so daß hier keine Erklärung für die Hemmwirkung beider Inhibitoren auf bestrahlte Zellen gefunden wurde.

c. Erfassung der außerplanmäßigen DNS-Synthese

Obwohl ein eindeutiger Beweis bisher nicht erbracht ist, daß das Stattfinden einer außerplanmäßigen DNS-Synthese bzw. Reparatur-Replikation die Überlebensrate geschädigter Säugetierzellen steigert, wie dies in Bakterien der Fall ist (178) sprechen doch einige Tatsachen dafür:

1. Hautfibroblastenzellen, die von einem an Xeroderma pigmentosum erkrankten Patienten gewonnen wurden, weisen nur eine stark reduzierte Reparatur-Replikation auf (179). Dies steht in eindeutigen Zusammenhang mit der hohen UV-Empfindlichkeit und der Unfähigkeit dieser Zellen, UV-induzierte Pyrimidin-Dimere zu eliminieren (117, 127).

2. Painter et. al. (180) haben nachgewiesen, daß geschädigte WI-38-Zellen und HeLa-Zellen, in denen eine Reparatur-Replikation stattgefunden hatte, anschließend zur semikonservativen DNS-Synthese befähigt waren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die außerplanmäßige DNS-Synthese durch Bestimmung der Einbaurrate von ^3H -TdR in bestrahlte Zellen in Gegenwart von 3 mM/l Oxyharnstoff nachgewiesen.

Oxyharnstoff unterdrückt in unbestrahlten Zellen die semikonservative DNS-Synthese weitgehend (88-907), während in UV- bzw. Röntgen-bestrahlten oder mit alkylierenden Substanzen behandelten Zellen eine außerplanmäßige DNS-Synthese nicht gehemmt wird (79, 156).

Wie aus Abbildung 26 zu ersehen ist, wird durch UV- und Röntgenbestrahlung die DNS-Syntheserate (gemessen als Einbau von ^3H -TdR in die säureunlösliche Fraktion) bereits durch geringe Strahlendosen gehemmt. Coffein hat sowohl auf die Einbaurrate UV- als auch Röntgen-bestrahlter Zellen keinen eindeutig meßbaren Einfluß (Tab. 10). Hierdurch wird gezeigt, daß die Hemmwirkung des Coffeins auf UV-bestrahlte H. Ep. 2 - Zellen nicht auf einer Hemmung der Reparatur-Replikation beruht.

Nach einer UV-Dosis von 240 Erg/mm^2 ist in Übereinstimmung mit Cleaver (119) das Maximum des Schadens gesetzt, der durch außerplanmäßige DNS-Synthesetätigkeit der Zellen behoben werden kann. Noch nach 5000 Erg/mm^2 UV-Strahlung wird die gleiche außerplanmäßige Einbaurrate gemessen.

Bei der Beurteilung der Einbaurrate ist auffällig, daß nach UV-Dosen von 750 und 5000 Erg/mm^2 nach Inkubation in Inhibitor-freiem und Oxyharnstoff-haltigem Medium die gleiche Einbaurrate gemessen wurde. Hieraus wird ge-

folgt, daß auch nach Erliegen der semikonservativen DNS-Replikation eine außerplanmäßige DNS-Synthese stattfindet.

Nach Röntgenbestrahlung wurde eine geringere Hemmung der semikonservativen DNS-Synthese gefunden als nach UV-Bestrahlung. In gleichem Maße wurde nach Röntgen-Bestrahlung nur eine geringe außerplanmäßige DNS-Synthese nachgewiesen.

Die geringe Hemmung der semikonservativen Replikation nach Röntgenbestrahlung steht in Einklang mit der geringen Hemmung der Proliferationsfähigkeit der Zellen (s.S. 69).

Gleichzeitig zeigt die geringe außerplanmäßige DNS-Synthese, daß ein möglicher Reparatur-Mechanismus von Röntgenshäden von einem entsprechenden Mechanismus nach UV-Schäden abweicht.

Für die Reparatur von UV-Schäden ist das auf Seite 35 wiedergegebene Schema nach den vorliegenden Ergebnissen als wahrscheinlich anzusehen. Für die Reparatur von Röntgenshäden diskutieren Spiegler und Norman (153) und Little (172) die Möglichkeit, daß je Röntgen-induzierten Strangbruch nur 1 - 2 Nucleotide eliminiert und wieder eingebaut werden. Dies würde den vorliegenden Ergebnissen über die außerplanmäßige DNS-Synthese und den geringen Röntgen-induzierten DNS-Abbau entsprechen.

d. Nachweis einer Reparatur mit Hilfe der Koloniefähigkeit

Zusammenfassende Arbeiten von Metzger (97) Sauerbier (186) lassen es als gesichert erscheinen, daß Coffein

den Ablauf von Dunkelreparatur-Prozessen in DAR^+ -Bakterien nach UV-Einstrahlung hemmt.

Rauth (77) wies 1967 nach, daß Coffein die Kolonieformfähigkeit UV-bestrahlter Maus-L-Zellen stark herabsetzt. Die Wirkung des Coffeins auf UV-bestrahlte Maus-L-Zellen entspricht der Wirkung auf UV-bestrahlte DAR^+ -Bakterien, da die Wirkung 1. konzentrationsabhängig, 2. auf die Zeit unmittelbar nach der Bestrahlung und 3. auf UV-Strahlung begrenzt ist.

Rauth (77) inkubierte die Maus-L-Zellen nach der UV-Bestrahlung bis zur Ausbildung makroskopisch sichtbarer Kolonien in Coffein-haltigem Medium.

Eigene Untersuchungen der Proliferationsfähigkeit von H. Ep. 2 - Zellen ergaben eine erhebliche Hemmung der Proliferation in den von Rauth verwendeten Coffein-Konzentrationen (0,5 - 2 mM/l), wie aus Abbildung 8 zu ersehen ist. Die gleiche Hemmung wurde auch bei der Untersuchung der Wirkung von Coffein auf die Kolonieformfähigkeit der Zellen gefunden: Die in Coffein-haltigem Medium ausgebildeten Kolonien waren erheblich kleiner als in gleicher Zeit in Inhibitor-freiem Medium ausgebildete Kolonien. Die in Abb. 12 wiedergegebene Dosis-Effekt-Kurve für steigende Coffeinkonzentrationen beinhaltet daher insofern einen Fehler, als ein großer Anteil der gezählten Kolonien (bis zu 70 %) nach 12-tägiger Inkubation in den Coffein-Konzentrationen 2 und 3 mM/l gerade die Größe von 50 Zellen pro Kolonie erreicht hatte, die als Kriterium für wiedererlangte Kolonieformfähigkeit in bestrahlten Zellen gesetzt wurde. Durch eine Verlängerung der Inkubationszeit nahm die Größe der Kolonien nur sehr langsam zu. Hieraus wird gefolgert, daß die Zellen bei dauernder Inkubation in Coffein-haltigem Medium

möglicherweise geschädigt werden. Dies beinhaltet die Möglichkeit, daß UV-Strahlung und Coffein eine additive Schädigung bewirken und es daher zum starken Abfall der Dosis-Effekt-Kurven kommt. Hierdurch wird zwar die Möglichkeit der Hemmung eines Reparaturvorganges nicht ausgeschlossen, der Nachweis der Hemmung gestaltet sich jedoch schwieriger. Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Arbeit die Versuchsanordnungen so gewählt, daß nebeneinander die zeitlich begrenzte Einwirkung des Coffeins und die Wirkung bei fortlaufender Inkubation in Coffein-haltigem Medium untersucht wurden.

Wie aus Abbildung 13^f zu ersehen ist, werden H. Ep. 2 - Zellen durch 24-stündige Inkubation in Coffein-haltigem Medium bis zu Konzentrationen von 4 mM/l nicht in ihrer Kolonieformfähigkeit beeinträchtigt. Nach Einwirkung von 20 mM/l Coffein für 24 Stunden waren noch 13 % der inkubierten Zellen zur Ausbildung von Kolonien fähig. Diese Kolonien unterschieden sich in ihrer Größe und Zelldichte nicht von Kolonien, die in Inhibitor-freiem Medium gebildet worden waren.

Beim Vergleich der Dosis-Effekt-Kurven in den Abbildungen 15 und 16 ergibt sich, daß die UV-Dosis-Effekt-Kurven der ausschließlich in Coffein-haltigem Medium inkubierten Zellen steiler verlaufen als die von Zellen, die nur 24 Stunden lang in Coffein-haltigem Medium inkubiert wurden. Gleichzeitig ist aber zu erkennen, daß durch 1 mM/l Coffein in beiden Dosis-Effekt-Kurven keine Schulter mehr ausgebildet wird und daß das 24-stündige Einwirken von 1 mM/l Coffein eine eindeutige Hemmung der Kolonieformfähigkeit bewirkt. Die Hemmung der Kolonieformfähigkeit UV-bestrahlter Zellen durch Coffein wird durch 24-stündige Inkubation in Inhibitor-freiem Medium nach der Bestrahlung weitgehend aufgehoben.

Bei anschließender fortlaufender Inkubation in Coffeinhaltigem Medium ist die Hemmung noch eindeutig nachzuweisen. Bei der auf 24 Stunden befristeten Inhibitor-einwirkung nach vorangegangener Inkubation ist erst bei Konzentrationen über 3 mM/l Coffein eine geringe Hemmung festzustellen.

Rauth (77) fand ebenfalls, daß die Hemmwirkung des Coffeins erst nach 30 Stunden Inkubation in Inhibitor-freiem Medium vollständig aufgehoben wurde, obwohl der Generationszyklus in Maus-L-Zellen nur 16 Stunden beträgt. Er gibt dafür zwei mögliche Erklärungen an:

1. Der induzierte Schaden ist nicht in allen Zellen gleich und je schwerer die Zellen geschädigt sind, umso längere Zeit benötigen sie für die Dunkelreparatur.
2. Die Fähigkeit der Zellen, eine Dunkelreparatur durchzuführen, hängt davon ab, daß die Zellen eine spezifische Phase des Zellzyklus in Abwesenheit von Coffein durchlaufen. Insbesondere die Annahme 2 wird durch Untersuchungen von Rauth (77) und Domon und Rauth (78, 105) gestützt. Die Autoren zeigten, daß die Wirkung des Coffeins auf die frühe S-Phase UV-bestrahlter Zellen beschränkt ist.

Der Schluß, daß H. Ep. 2 - Zellen in Abwesenheit von Coffein eine Dunkelreparatur durchführen, wird durch die in Abbildung 17 wiedergegebenen Ergebnisse bekräftigt. Abbildung 17 gibt den zeitlichen Ablauf des Reparaturvorganges wieder. Der stetige Anstieg der Kolonieformfähigkeit nach verlängerter Inkubation vor Zugabe des Coffeins bestätigt die Ergebnisse von Rauth (77) und Domon und Rauth (78,105), daß die Hemmwirkung des Coffeins erst nach Durchlaufen der S-Phase aufgehoben wird.

Einen weiteren Hinweis, daß die Hemmung UV-bestrahlter Zellen durch Coffein nicht auf einer additiven Schädigung, sondern auf der Hemmung eines Reparaturvorganges beruht, haben Cleaver und Thomas (181) erbracht. Sie zeigten mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation, daß UV-Strahlung in chinesischen Hamsterzellen eine Abnahme des DNS-Molekulargewichts bewirkt. Diese Abnahme ist durch Inkubation der bestrahlten Zellen teilweise reversibel, während durch Inkubation in Coffein-haltigem Medium keine Zunahme des DNS-Molekulargewichts erfolgt. Eine Wirkung des Coffeins auf unbestrahlte Zellen konnten Cleaver und Thomas nicht feststellen.

Wie McGrath und Williams (63) nachgewiesen haben, beruht die Abnahme des Molekulargewichts bestrahlter DNS auf Strangbrüchen der DNS. Es kann gefolgert werden, daß eine durch Inkubation erfolgte Zunahme des Molekulargewichts bestrahlter Zellen auf die Eliminierung von Strangbrüchen zurückzuführen ist.

Cleaver und Thomas (181) vermuten ebenfalls, daß Coffein seine Wirkung auf die Wiedervereinigung von Einzelsträngen während der semikonservativen Replikation ausübt, da weder eine Coffein-Wirkung auf die Eliminierung von Pyrimidin-Dimeren noch auf die außerplanmäßige DNS-Synthese bzw. Reparatur-Replikation in HeLa-Zellen nachgewiesen werden konnte (79).

Rauth und Mitarbeiter (183) und Walker und Reid (84) konnten eine der Hemmung UV-bestrahlter Zellen entsprechende Wirkung des Coffeins auf mit verschiedenen alkylierenden Substanzen behandelte Maus-L-Zellen nachweisen. So wird die Reparatur der Schäden gehemmt, die durch folgende alkylierende Substanzen verursacht werden: Mitomycin C

(Rauth, 183), 2,5-Dimethyl-sulfoxy-hexan, Methylmethan-sulfonat, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin, N-Methyl-N-nitrosoharnstoff und Senfgas (Walker und Reid, 84).

Bei der Untersuchung der Wirkung von Oxyharnstoff auf UV-bestrahlte H. Ep. 2 - Zellen wurde ebenfalls eine Hemmung der Kolonieformfähigkeit gefunden, die auf die ersten 24 Stunden nach der Bestrahlung beschränkt zu sein scheint (Abb. 18 und 19). Insbesondere der Anstieg der Kolonieformfähigkeit durch Inkubation der bestrahlten Zellen in Inhibitor-freiem Medium vor dem Zusatz von Oxyharnstoff zum Medium zeigt, daß Oxyharnstoff in den Ablauf eines Reparaturvorganges eingreift. Bei der Untersuchung der Wirkung von ultraviolettem Licht auf HeLa-Zellen wiesen Ben-Hur und Ben-Ishai (182) die Wiedervereinigung von Strangbrüchen nach, die als Folge der Excision von Pyrimidin-Dimeren entstanden waren. Durch Oxyharnstoff (und Acriflavin) wurde die Wiedervereinigung der DNS-Stränge verhindert. Die Hemmung der Reparatur durch Oxyharnstoff wurde durch Zugabe aller vier Desoxyribonucleoside in geringen Konzentrationen aufgehoben, während die semikonservative DNS-Synthese weiterhin gehemmt wurde.

Dieses Ergebnis kann dahingehend gedeutet werden, daß Coffein und Oxyharnstoff in unterschiedlicher Weise in den Reparaturablauf von UV-Schäden eingreifen.

Eine Erklärung für die Hemmung der Kolonieformfähigkeit unbestrahlter H. Ep. 2 - Zellen durch Oxyharnstoff fanden Coyle und Strauß (92). Sie wiesen nach, daß Oxyharnstoff die semikonservative DNS-Synthese hemmt und Strangbrüche in der DNS bewirkt.

Bei der Einwirkung von Coffein auf Röntgen-bestrahlte H. Ep. 2 - Zellen wurde keine bzw. in höheren Konzentrationen nur eine geringe Hemmwirkung des Coffeins gefunden (Abb. 20 und Tab. 4). Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen von Rauth (71) überein, der in Röntgen-bestrahlten Maus-L-Zellen keine Hemmwirkung durch Coffein nachweisen konnte.

Die geringe Hemmwirkung hoher Coffein-Konzentrationen spricht für einen additiven Effekt von Röntgenbestrahlung und Coffeineinwirkung. Oxyharnstoff dagegen bewirkt in Röntgen-bestrahlten H. Ep. 2-Zellen einen konzentrationsabhängigen Abfall der Kolonieformfähigkeit (Abb.21). Nach vorangegangener Inkubation in Inhibitor-freiem Medium wird die Hemmwirkung des Oxyharnstoff auf Röntgen-bestrahlte H. Ep. 2 - Zellen bereits nach 12 Stunden Inkubationszeit weitgehend aufgehoben (Abb. 22). Beim Vergleich des zeitlichen Ablaufs der Reparatur von UV- und Röntgenschäden (Abb. 17,19 und 22) ist zu ersehen, daß die Reparatur von Röntgenschäden nach erheblich kürzerer Inkubationszeit abgeschlossen ist und nicht an die S-Phase des Zellzyklus gebunden zu sein scheint.

Dies spricht für einen anderen Mechanismus der Reparatur von Röntgenschäden als von UV-Schäden.

Insbesondere die geringere außerplanmäßige DNS-Synthese (Abb. 26) und das Fehlen eines DNS-Abbaus nach Röntgenbestrahlung (Abb. 27) deuten darauf hin, daß in Säugetierzellen die Reparatur von Röntgen-induzierten Strangbrüchen einem einfacheren Mechanismus folgt als die Reparatur von UV-Schäden.

3. Schlußfolgerungen

Die mit Hilfe der Kolonieförmfähigkeit erzielten Ergebnisse sowie der Nachweis der Eliminierung UV-induzierter Pyrimidin-Dimere aus der DNS lassen den Schluß zu, daß H. Ep. 2 - Zellen zur Reparatur von UV-Schäden in der Lage sind. Dies stimmt mit Untersuchungen von Coyle und Strauss (171) überein, die aus der unterschiedlichen Einwirkung eines Enzyms aus *M. lysodeikticus* auf die UV-bestrahlte DNS von H. Ep. 2 - Zellen nach verschiedenen langen Inkubationszeiten folgerten, daß H. Ep. 2 - Zellen befähigt sind, Pyrimidin-Dimere zu eliminieren und die durch die Eliminierung entstandenen Strangbrüche wieder zu schließen.

Ferner sprechen die nachgewiesene außerplanmäßige DNS-Synthese sowie der strahlen-induzierte DNS-Abbau für das Vorhandensein eines Reparatur-Mechanismus für UV-Schäden.

Lytle (184) wies nach, daß H. Ep. 2 - Zellen zur Wirtszellreaktivierung von UV-bestrahlten Herpes simplex-Viren in der Lage sind, was ebenfalls auf das Vorhandensein eines Reparaturmechanismus für UV-Schäden hindeutet.

Die nach Röntgenbestrahlung gefundene Hemmung der Kolonieförmfähigkeit der Zellen durch Oxyharnstoff sowie die Abnahme dieser Hemmbarkeit durch Inkubation der Zellen in Inhibitor-freiem Medium lassen den Schluß zu, daß H. Ep. 2-Zellen in begrenztem Umfang auch Röntgenschäden reparieren.

Aus der fehlenden Empfindlichkeit röntgenbestrahlter Zellen gegenüber Coffein sowie aus der schnelleren Abnahme der Empfindlichkeit röntgenbestrahlter Zellen gegenüber Oxyharnstoff kann geschlossen werden, daß die Reparatur von UV- und Röntgenschäden auf zumindest teilweise voneinander unabhängigen Mechanismen beruht. Hierfür sprechen auch die geringe außerplanmäßige DNS-Synthese und der geringe DNS-Abbau nach Röntgenbestrahlung.

F. Zusammenfassung:

In der vorliegenden Arbeit wird das strahlenbiologische Verhalten von H. Ep. 2 - Zellen untersucht. Hierbei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. In UV-bestrahlten Zellen wurde mit Hilfe der Kolonieformfähigkeit ein durch Coffein und Oxyharnstoff hemmbarer Reparaturmechanismus nachgewiesen. Nach Röntgenbestrahlung war diese Hemmung nur durch Oxyharnstoff zu erzielen.

Die Hemmwirkung von Coffein und Oxyharnstoff auf UV-bestrahlte H. Ep. 2 - Zellen ist auf die ersten 24 Stunden nach der Bestrahlung begrenzt, während die Hemmwirkung von Oxyharnstoff auf röntgenbestrahlte H. Ep. 2 - Zellen bis zu 12 Stunden nach der Bestrahlung eindeutig nachweisbar ist.

2. Es wurde gezeigt, daß H. Ep. 2 - Zellen zur Eliminierung von UV-induzierten Pyrimidin-Dimeren befähigt sind. Die Eliminierung wird weder durch Coffein noch durch Oxyharnstoff gehemmt.

Die Signifikanz der Dimeren-Eliminierung wurde mit Hilfe des H - Tests nach Kruskal und Wallis (nach Sachs, 1975) gesichert.

3. Nach UV-Bestrahlung konnte sowohl eine Abgabe von Radioaktivität durch ^3H -TdR-markierte Zellen an das Inkubationsmedium als auch ein außerplanmäßiger Einbau von ^3H -TdR in Oxyharnstoff-haltigem Medium in die säureunlösliche Fraktion der Zellen nachgewiesen werden. Nach Röntgenbestrahlung waren beide Prozesse erst nach Einstrahlung hoher Dosen (5000 rad) nachweisbar. Die Abgabe

von Radioaktivität aus der säureunlöslichen Fraktion der Zellen an das Inkubationsmedium wurde als strahlenbedingter DNS-Abbau und der Einbau von ^3H -TdR in die säureunlösliche Fraktion in Gegenwart von Oxyharnstoff als aussergewöhnliche DNS-Synthese gedeutet.

Coffein und Oxyharnstoff erwiesen sich als ohne Einfluß auf den DNS-Abbau und durch Coffein-Einwirkung konnte keine Hemmung der DNS-Synthese nachgewiesen werden.

Es wird geschlossen, daß H. Ep. 2 - Zellen sowohl zur Reparatur von UV- als auch von Röntgenschäden in der Lage sind. Jedoch scheint die Reparatur von UV- und Röntgenschäden auf zumindest teilweise voneinander unabhängigen Mechanismen zu beruhen.

Die nachgewiesene Dimeren-Eliminierung steht mit Untersuchungen von Coyle und Strauss (171) in Einklang. Die Hemmung der Kolonieformfähigkeit UV-bestrahlter H. Ep. 2 - Zellen durch Coffein entspricht der von Rauth (77) nachgewiesenen Hemmwirkung von Coffein auf UV-bestrahlte Maus-L-Zellen.

G. Literaturverzeichnis

1. Beukers, R., J. Ylstra und W. Berends
The effect of ultraviolet light on some components
of the nucleic acids.
Rec. trav. chim. 77, 729 (1958)
2. Beukers, R., W. Berends
Isolation and identification of the irradiation
product of thymine.
Biochim. Biophys. Acta 41, 550 (1960)
3. Wacker, A., D. Weinblum, L. Träger, Z.H. Moustafa
Photochemische Reaktionen von Uracil und Uridin.
J. Mol. Biol. 3, 790 (1961)
4. Wacker, A., H. Dellweg, E. Lodemann
Strahlenchemische Veränderungen der Nukleinsäuren.
Angew. Chemie 73, 64 (1961)
5. Smith, K.C.,
Photochemical reactions of thymine, uracil, uridine,
Cytosine and Bromouracil in frozen solutions and in
dried films.
Photochem. Photobiol. 2, 503 (1963)
6. Wacker, A., L. Träger, D. Weinblum
Strahlenchemische Veränderungen von Pyrimidinribosiden
und Pyrimidinen.
Angew. Chem. 73, 65 (1961)
7. Wacker, A.
in Progress in Nucleic Acid Research
Vol, I, S. 381 (1963)
Ed. J. N. Davidson und W.E. Cohn
Academic Press N. Y., London

8. Weinblum, D.
Characterization of the Photodimers from DNA.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 384 (1967)
9. Varghese, A.J. und C.S. Rupert
UV-irradiation of cytosine nucleosides in frozen
solutions produces cyclobutane-type dimeric products.
Photochem. Photobiol. 13, 365 (1971)
10. Weinblum, D., Johns, H.E.
Isolation and properties of isomeric Thymine Dimers.
Biochem. Biophys. Acta 114, 450 (1966)
11. Wacker, A., E.R. Lochmann
Zur strahlenchemischen Dimerisierung des Thymins.
Z. Naturforschung 17 b, 351 (1962)
12. Smith, K., P.C. Hanawalt
Molecular Photobiology
Academic Press, New York 1969
13. Smith, K.C.
Dose dependent decrease in extractability of DNA from
Bacteria following irradiation with ultraviolet light
or with visible light plus DYE.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 8, 157 (1962)
14. Smith, K.C.
The photochemical interaction of deoxyribonucleic
acid and protein in vivo and its biological importance.
Photochem. Photobiol. 3, 415 (1964)
15. Smith, K.C. und R.T. Aplin
A mixed photoproduct of uracil and cysteine (5-S-
cysteine-6-hydrouracil).
A possible model for the in vivo crosslinking of DNA
and protein by ultraviolet light.
Biochemistry 5, 2125 (1966)

16. Smith, K.C.
Photochemical additon of amino acids to ^{14}C -Uracil.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 34, 354 (1969)
17. Wacker, A., H. Dellweg, D. Weinblum
Strahlenchemische Veränderungen der Bakterien-DNS
in vivo.
Naturwiss. 47, 477 (1960)
18. Setlow, R.B., J.K. Setlow
Evidence that ultraviolet-induced thymine dimers
in DNA cause biological damage.
Proc. Nat. Ac. Sci. 48, 1250 (1962)
19. Wulff, D.L., C.S. Rupert
Disappearance of thymine photo dimer in ultraviolet
irradiated DNA upon treatment with a photoreactivating
enzyme from baker s yeast.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 237 (1962)
20. Rupert, C.S.
Questions regarding the presumed rule of thymine
dimer in photoreactivable lesions in DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. 53, 1430 (1964)
21. Trosko, J.E., V.H. Mansour
Photoreactivation of ultraviolet light-induced pyrimidine dimers in Ginkgo cells grown in vitro
Mutation Res. 7, 120 (1969)
22. Rupert, C.S., W. Harm
Reactivation after Photobiological Damage
in "Advances in Radiation Biology", Vol. 2,
Academic Press, New York, 1966

23. Boyce, R. P., P. Howard-Flanders
Release of ultraviolet light-induced thymine dimers
from DNA in *E. coli* k-12.
Proc. Nat. Acad. Sci. 51, 293 (1964)

24. Hartmann, D.
Die Spaltung von Dimerem Thymin durch ionisierende
Strahlung und ihre Wirkung bei der Inaktivierung von
Bakterien.
Habilitationsschrift FB 2, Freie Universität Berlin, 1970

25. Setlow, J.K.
Photoreactivation
Radiat. Research Suppl. 6, 141 (1966)

26. Jagger, J., R.S. Stafford
Evidence for two Mechanisms of Photoreactivation in
E. coli B.
Biophys. J. 5, 75 (1965)

27. Dertinger, H., H. Jung
in "Molekulare Strahlenbiologie"
Springer-Verlag, Berlin 1969

28. Kelner, A.
Effect of visible light on the recovery of *Strepto-*
myces griseus conidia from irradiation injury.
Proc. Nat. Acad. Sci. 35, 73 (1949)

29. Dulbecco, R.
in "Radiation Biology", Vol. 2,
McGraw-Hill, New York, 1955

30. Rupert, C.S., W. Harm
Reactivation after photobiological damage
in "Advances in Radiation Biology", Vol. 2,
Academic Press, New York, 1966

31. Rupert, C.S.
Photoreactivation of transforming DNA by an enzyme from baker's yeast.
J. Gen. Physiol. 43, 573 (1960)
32. Rupert, C.S.
Repair of ultraviolet damage in cellular DNA.
J. Cellular Comp. Physiol. Suppl. 1, 58, 57 (1961)
33. Rupert, C.S.
a) Photoenzymatic repair of ultraviolet damage in DNA.
I. Kinetics of reaction.
b) II. Formation of an enzyme-substrate complex.
J. Gen. Physiol. 45, a) 703, b) 725 (1962)
34. Rupert, C.S., S.H. Goodgal, R.M. Herriott
Photoreactivation in vitro of ultraviolet inactivated Hemophilus influenzae transforming factor.
J. Gen. Physiol. 41, 451 (1958)
35. Cook, J.S.
Direct demonstration of the monomerisation of thymine containing dimers in UV irradiated ^DNA by yeast photo-reactivating enzyme and light.
Photochem. Photobiol. 6, 97 (1967)
36. Bollum, F.B., R.B. Setlow,
UV inactivation of DNA primer activity
I. Effects of different wavelengths and doses.
Biochim. Biophys. Acta 68, 599 (1963)
37. Jagger, J.
Photoreactivation
Bact. Rev. 22, 99 (1958)

38. Rupert, C.S.
Photoreactivation of ultraviolet damage
in "Photophysiology", Vol. 2,
Ed. A. C. Giese
Academic Press, New York 1964
39. Setlow, R.B., W.L. Carrier
The disappearance of Thymine Dimers from DNA: An
error correcting mechanism.
Proc. Nat. Acad. Sci. 51, 226 (1964)
40. Howard-Flanders, P., R.P. Boyce
DNA repair and genetic recombination:
Studies on mutants of E. coli defective in these
processes.
Radiat. Res. Suppl. 6, 156 (1966)
41. Pettijohn, D., P.C. Hanawalt
Evidence for repair replication of ultraviolet damaged
DNA in bacteria.
J. Mol. Biol. 9, 395 (1964)
42. Howard-Flanders, P.
DNA - Repair
Ann. Rev. Biochem. 37, 175 (1968)
43. Haynes, R.H.
General Diskussion
Radiat. Res. Suppl. 6, 231 (1966)
44. Hill, R.F.
Ultraviolet-induced lethality and reversion to photo-
trophism in E. coli strains with normal and reduced
dark repair ability.
Photochem. Photobiol. 4, 563 (1965)

45. Witkin, E.M.
Radiation-induced mutations and their repair.
Science 152, 1345 (1966)
46. Carrier, W.L., R.B. Setlow
Excision of pyrimidine dimers from irradiated DNA
in vitro.
Biochim. Biophys. Acta 129, 318 (1966)
47. Kaplan, J.C., S.R. Kushner, L. Grossmann
Enzymatic repair of DNA. 1. Purification of two
enzymes involved in the excision of thymine dimers
from UV irradiated DNA.
Proc. Nat. Acad. Sci. 63, 144 (1969)
48. Kneser, H., K. Metzger und W. Sauerbier
Evidence of different mechanisms for ultraviolet
reactivation and "Ordinary Host Cell Reactivation"
of Phage.
Virology 27, 213 (1965)
49. Kaplan, H.S., K.C. Smith, P.A. Tomlin
Effect of halogenated pyrimidines on radiosensitivity
of E. coli
Radiat. Res. 16, 98 (1962)
50. Hüttermann, J., A. Müller
Free radicals in irradiated single crystals of
5-halo-uracil derivatives: 5-bromouracil, 5-bromo-
deoxyuridine and 5-iododeoxyuridine
Int. J. Rad. Biol. 15, 297 (1969)
51. Wulff, D. L., G. Fraenkel
On the nature of thymine photoproduct
Biochim. Biophys. Acta 51, 332 (1961)

52. Kaplan, H.S., R. Zavarine
Correlation of bacterial radiosensitivity and DNA
base composition
Biochem. Biophys. Res. Commun. 8, 432 (1962)

53. Szybalski, W.
Molecular events resulting in radiation injury,
repair and sensitization of DNA
Radiat. Res. Suppl. 7, 147 (1967)

54. Platzmann, R.L.
Vortex 23, 372 (1962)

55. Conlay, J.J.
Effect of ionizing radiation on Adenine in aerated
and de-aerated aqueous solutions.
Nature 197, 555 (1963)

56. Lochmann, E.R., D. Weinblum, und A. Wacker
Strahlenwirkung und Strahlenschutz bei Röntgenbe-
strahlung von Nucleinsäuren.
Biophysik 1, 396 (1964)

57. Teoule, R. J. Cadet
Chromatographie des produits de radiolyse de la thymine.
J. Chromatog. 43, 368 (1966)

58. Schmidt, B., D. Hartmann, K. Großgebauer, W. Schumacher
Die Aufspaltung von Dimerem Thymin in monomeres durch
ionisierende Strahlung
Naturwiss. 50, 473 (1963)

59. Schmidt, B., D. Hartmann, K. Großgebauer, W. Schumacher
Splitting of Uracil dimer by high energy electrons.
Nature 199, 504 (1963)

60. Lochmann, E.-R.
Strahlenwirkung und Strahlenschutz bei Röntgenbe-
strahlung von Nukleinsäuren
Biophysik 1, 396 (1964)
61. Hartmann, D.
Bestrahlung von Bakterien und Nukleinsäurebausteinen
mit schnellen Elektronen.
Zbl. Bakt. Ref. 209, 434 (1967)
62. Greulich, V., D. Hartmann und B. Schmidt
Spaltung von dimerem Thymin in E. coli durch schnelle
Elektronen
Z. Naturforschung 23b, 755 (1968)
63. McGrath, R.A., R.W. Williams
Reconstruction in vivo of irradiated E. coli DNA,
the rejoining of broken pieces.
Nature 212, 534 (1966)
64. McGrath, R.A., R.W. Williams, D.C. Swartzendruber
Break down of DNA in x-irradiated E. coli
Biophys. J. 6, 113 (1966)
65. Haynes, R.H.
Role of DNA repair mechanisms in microbial inactivation
and recovery phenomena
Photochem. Photobiol. 3, 429 (1964)
66. Fangmann, W.L., M. Russel
x-irradiated sensitivity in E. coli defective in DNA
replication
Molec. gen. Genetics 110, 332 (1971)
67. Dean, C.J., P. Feldschreiber, J.T. Lett
Repair of x-ray damage to the DNA in Micrococcus radiodurans
Nature 209, 49 (1966)

68. Frampton, E.W., D. Billen
x-ray induced degradation of deoxyribonucleic acid
by a polyauxotrophic bacterium.
Radiat. Res. 28, 109 (1966)
69. Emmerson, P.T., P. Howard-Flanders
Postirradiation degradation following exposure of UV-
sensitive and resistant bacteria to x-rays.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 24 (1964)
70. Miletic, B., L. Kucan, D.J. Novak
Effect of repeated x-irradiation on the process of degradation of deoxyribonucleic acid.
Nature 202, 106 (1966)
71. Achey, P.M., E.C. Pollard
Studies on the radiation-induced breakdown of deoxyribonucleic acid in E. Coli 15T⁻L⁻.
Radiat. Res. 31, 47 (1967)
72. Pollard, E., J. Swez, L. Grady
Physical characteristics of the residual DNA in bacterial cells after degradation due to ionizing radiation.
Radiat. Res. 28, 585 (1966)
73. Klein, R.M.
Interactions ultraviolet and visible radiations
on the growth of cell aggregates of Ginkgo pollen tissue.
Physiol. Plantarum 16, 73 (1963)
74. Ikenaga, M., T. Mabuchi
Photoreactivation of endosperm mutations induced by ultraviolet light in maize.
Radiation Botany 6, 165 (1966)

75. Saito, N., H. Werbin
Evidence for a DNA-photoreactivating enzyme in higher plants
Photochem. Photobiol. 9, 389 (1969)
76. Rasmussen, R.E., R.B. Painter
Evidence for repair of UV damaged DNA in cultured mammalian cells.
Nature 203, 1360 (1964)
77. Rauth, A.M.
Evidence for dark ractivation of UVL-damage in mouse l cells.
Radiat. Res. 31, 121 (1967)
78. Domon, M., A.M. Rauth
Effects of caffeine on UV irradiated mouse l cells.
Radiat. Res. 39, 207 (1969)
79. Cleaver, J.E.
Repair replication of mammalian cell DNA: Effects of copounds that inhibit DNA synthesis or dark repair.
Radiat. Res. 37, 334 (1969)
80. Cleaver, J.E.
Repair replication and degradation of bromouracil - substituted DNA in mammalian cells after irradiation with UVL.
Biophys. J. 8, 775 (1968)
81. Roberts, J.J., A.R. Crathorn und T.P. Brent
Repair of alkylated DNA in mammalian cells.
Nature 218, 970 (1968)
82. Coyle, M.B., B.S. Strauss
Characteristics of DNA synthesised by methyl-methane-sulfonate-treated HEp-2 cells.
Chem. Biol. Interactions 1, (1969/70) 89 - 98

83. Strauss, E., M. Coyle, M. Robbins
Alkylation Damage and its Repair
Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology
Vol. XXXIII, 1968

84. Walker, I.G., B.D. Reid
Caffeine potentiation of the letal action of alkylating
agents on L-cells.
Mutation Res. 12, 101 (1971)

85. Handschumacher, R.E., A.D. Welch
Agents which influence nucleic acid metabolism.
in "The Nucleic Acids " Vol. III, pp. 453 ff.
Academic Press, New York and London, 1960

86. Neuhard, J.
Studies on the acid-soluble nucleotide pool in E. coli
IV. Effects of Hydroxyurea.
Biochim. Biophys. Acta 145, 1 (1967)

87. Warner, H.R., M.D. Hobbs
Effects of Hydroxyurea on replication of bacteriophage
T 4 in E. coli
J. Virol. 3, 331 (1969)

88. Young, C.W., G. Schochteman, D.A. Karnofsky
Hydroxyurea-induced inhibition of Deoxyribonucleotide
Synthesis: Studies in intact cells.
Cancer Res. 27, 526 (1967)

89. Pfeiffer, S.E., L.J. Tolmach
Inhibition of DNA synthesis in HeLa cells by hydroxy-
urea.
Cancer Res. 27, 124 (1967)

90. Rosenkranz, H.S., S.J. Jacobs, H.S. Carr
Studies with hydroxyurea. VIII. The deoxyribonucleic acid of hydroxyurea treated cells.
Biochim. Biophys. Acta 161, 428 (1968)

91. Sinclair, W.K.
Hydroxyurea: Effects on Chinese hamster cells grown in culture.
Cancer Res. 27, 297 (1967)

92. Coyle, M.B., B. Strauss
Cell killing and accumulation of breaks in the DNA of H. Ep.-2 cells incubated in the presence of hydroxyurea.
Cancer Res. 30, 2314 (1970)

93. Heidelberger, C.
Fluorinated pyrimidines.
Progr. Nucleic Acid Res. Mol Biol. 4, 1 (1965)

94. Gittelson, B.L., I.O. Walker
The interaction of proflavin with deoxyribonucleic acid and deoxynucleohistone.
Biochim. Biophys. Acta 138, 619 (1967)

95. E. Wikin
Modification of ultraviolet mutagenesis by bacteria with dyes.
J. Cellular Comp. Physiol. 58, (Suppl. 1), 135 (1961)

96. Hamilton, D.L., W. Fuller, E. Reich
Interaction of actinomycin C₁ and DNA.
Nature 198, 538 (1963)

97. Metzger, K.
On the dark-reactivation mechanism in ultraviolet irradiated bacteria.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 15, 101 (1964)

98. Puck, T.T., P.I. Marcus , S.J. Cieciura
Clonal groth of mammalian cells in vitro
J. Exp. Med. 103, 273 (1956)

99. Roulland-Dussoix, D.
Degradation by host, of DNA of phage λ after ultra-
violet irradiation.
Mutation Res. 4, 241 (1967)

100. Butcher, R.W., E.W. Sutherland
Adenosine 3', 5'-phosphate inbiological materials
J. Biol. Chem. 237, 1244 (1962)

101. H.L. Ennis, M. Lubin
Cycloheximidine: aspects of inhibition of protein
synthesis in mammalian cells.
Science 146, 1474 (1964)

102. Arlett, C.F.
A failure of specific inhibitors to affect survival
of Chinese hamster cells exposed to UVL.
Intern. J. Radiat. Biol. 13, 369 (1967)

103. Trosko, J.E., E.H.Y. Chu, W.L. Carrier
The induction of thymine dimers in UV-irradiated
mammalian cells.
Radiat. Res. 24, 667 (1965)

104. Humphrey, R.M., B.A. Sedita, R.E. Meyn
Recovery of Chinese hamster cells from ultraviolet
irradiation damage.
Int. J. Radiat. Biol. 18 61 (1970)

105. Domon, M., A.M. Rauth
UVL - irradiation of mouse-L-cells: Effects on cells
in DNA synthesis phase.
Radiat. Res. 40, 414 (1969)

106. Sinclair, W.K., R.A. Morton
X-ray and ultraviolet sensitivity of synchronized Chinese hamster cells at various stages of the cell cycle.
Biophys. J. 5, 1 (1965)

107. Withmore, G.F., S. Gulyas, J. Botond
Radiation sensitivity throughout the cell cycle and its relationship to recovery.
In 18. Annual Symposium on Fundamental Cancer Research, M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute , pp. 424 ff. Williams & Wilkins Co., Baltimore 1965

108. Rauth, A.M., G.F. Whitmore
The survival of synchronized L cells after UV irradiation
Radiat. Res. 28, 84 (1966)

109. Bootsma, D., R.M. Humphrey
The progression of mammalian cells through the division cycle following UV - irradiation.
Mut. Res. 5, 289 (1968)

110. Domon, M., A.M. Rauth
UVL - irradiation of Mouse - L - Cells: Effects on DNA Synthesis and progression through the cell cycle.
Radiat. Res. 35, 350 (1968)

111. Steward, D.L., R.M. Humphrey
Induction of Thymine dimers in synchronized populations of Chinese hamster cells
Nature 212, 298 (1966)

112. Djordjevic, B., L.J. Tolmach
Responses of HeLa cells to UV-irradiation at selected stages of the generation cycle.
Radiat. Res. 32, 327 (1967)

113. Cleaver, J.E., R.E. Painter
Evidence for repair replication of HeLa cell DNA
damaged by UVL.
Biochim. Biophys. Acta 161, 552 (1968)
114. Cleaver, J.E.
Investigations into the effect of UVL on the rate
of DNA synthesis in mammalian cells.
Biochem. Biophys. Acta 108, 42 (1965)
115. Cleaver, J.E.
Inhibition of DNA synthesis by UVL under controlled
temperature.
Nature 209, 1317 (1966)
116. Cleaver, J.E.
The relationship between the rate of DNA synthesis and
its inhibition by UVL in mammalian cells.
Radiat. Res. 30, 795 (1967)
117. Cleaver, J.E.
Xeroderma pigmentosum: A human disease in which
an initial stage of DNA repair is defective.
Proc. Nat. Acad. Sci. 63, 428 (1969)
118. Painter, R.E., J.E. Cleaver
Repair replication, unscheduled DNA synthesis and
repair of mammalian DNA.
Radiat. Res. 37, 451 (1969)
119. Cleaver, J.E.
Repair replication in Chinese hamster cells after
damage from ultraviolet light.
Photochem. Photobiol. 12, 17 (1970)

120. Smets, L.A.
Repair incorporation of pyrimidine deoxynucleosides
into DNA of mammalian cells exposed to UV.
Biophysik 6, 85 (1969)
121. Klimek, M.
Thymine dimerization in L-strain mammalian cells
after irradiation with UVL, and search for repair
mechanisms.
Photochem. Photobiol. 5, 603 (1966)
122. Klimek, M., M. Vlasinová
Thymine and uracil-thymine dimers and DNA synthesis
in mammalian cells irradiated with UVL.
Int. J. Rad. Biol. 11, 329 (1966)
123. Klimek, M.
Formation but no excision of Thymine dimers in mam-
malian cells after UV-irradiation.
Neoplasma 12, 559 (1965)
124. Trosko, J.E., M.R. Kasschau
Study of Pyrimidine dimers in mammalian cells surviving
low doses of ultraviolet radiations.
Photochem. Photobiol. 6, 215, (1967)
125. Reagan, J.D., J.E. Trosko, W.L. Carrier
Evidence for excision of UV-induced pyrimidin dimers
from the DNA of human cells in vitro.
Biophys. J. 8, 319 (1968)
126. Horikawa, M., O. Nikaido, T. Sujahara.
Dark reactivation of damage induced by UVL in
mammalian cells in vitro.
Nature 218, 489 (1968)

127. Setlow, R.B., J.D. Regan, J. German, W.L. Carrier
Evidence that Xeroderma Pigmentosum cells do not
perform the first step in the repair of UV damage
to their DNA.
Proc. Nat. Acad. Sci. 64, 1036 (1969)
128. Lindahl, T.
Excision of pyrimidine dimers from ultraviolet-
irradiated DNA by exonucleases from mammalian cells.
Europ. J. Biochem. 18, 407 (1971)
129. Trosko, J.E., M. Isoun
Lack of Photoreactivation in human cells grown in vitro.
Int. J. Rad. Biol. 18, 271 (1970)
130. Trosko, J.E., D. Krause, M. Isoun
Sunlight-induced pyrimidine dimers in human cells
in vitro.
Nature 228, 358 (1970)
131. Cleaver, J.E.
Photoreactivation, a radiation repair mechanism absent
from mammalian cells.
Biochim. Biophys. Res. Commun. 24, 569 (1966)
132. Cook, J.S., J.R. McGrath
Photoreactivating enzyme-activity in Metazoa.
Proc. Nat. Acad. Sci. 58, 1359 (1967)
133. Roth, D.
Photoenzymatic repair in mammalian cells revealed
by an acridine marker.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 33, 664 (1968)

134. Westra, A., G.W. Barundsen
Proliferation characteristics of cultured mammalian cells after irradiation with sparsely and densely ionizing radiations.
Int. J. Rad. Biol. 11, 477 (1966)
135. Dewey, W.C., R.M. Humphrey
Restitution of radiation-induced chromosomal damage in Chinese hamster cells related to the cell's life cycle.
Exptl. Cell Res. 35, 262 (1964)
136. Muta, N., S. Koiwai
Studies on the mechanism of radioresistance with HeLa cells
The Proc. Conf. Radiation Biology & Cancer, Kyoto 1966
Publ. Radiation Society of Japan, 1967
137. Muta, N., S. Koiwai
Studies on radioresistance with HeLa cells. Establishment of a radioresistant line.
Radiat. Res. 43, 332 (1970)
138. Bridges, B.A., J. Huckle
Mutagenesis of cultured cells by x-irradiation and ultraviolet light.
Mutation Res. 10, 141 (1970)
139. Lund, E., B. Rosengren
Survival of HeLa cells after largedoses of x-radiation
Int. J. Radiat. Biol. 11, 99 (1966)
140. Phillips, R.A., L.J. Tolmach
Repair of potentially lethal damage in x-irradiated HeLa cells.
Radiat. Res. 29, 413 (1966)
141. Petrovic, D.
New evidence concerning the molecular basis of the restorative effect of DNA in cultured mammalian cells.
Int. J. Radiat. Biol. 18, 243 (1970)

142. Lohman, P.H.
Induction and rejoining of breaks in the DNA of human cells irradiated at various phases of the cell cycle.
Mut. Res. 6, 449 (1968)
143. Sinclair, W.K.
Cyclic x-ray responses in mammalian cells in vitro.
Radiat. Res. 33, 620 (1968)
144. Sinclair, W.K., R.A. Morton
X-ray sensitivity during the cell generation cycle of cultured Chinese hamster cells
Radiat. Res. 29, 450 (1966)
145. Humphrey, R.M., D.L. Steward, B.A. Sedita
DNA-strand breaks and rejoining following exposure of synchronized Chinese hamster cells to ionizing radiation.
Mut. Res. 6, 459 (1968)
146. Little, J.B.
Irradiation of primary human amnion cell cultures: Effects on DNA synthesis and progression through the cell cycle.
Radiat. Res. 44, 674 (1970)
147. Manasek, F.J., S.J. Adelstein, C.P. Lyman
DNA-synthesis in irradiated lymphoid cells: Effect of temperature on the dose-response curve.
Int. J. Radiat. Biol. 10, 189 (1966)
148. Smets, L.A.
The dependency of thymidine incorporation on irradiation dose
Int. J. Radiat. Biol. 11, 197 (1966)

149. Smets, L.A.
Radiation-induced inhibition of thymidine incorporation by mammalian cell in vitro
Nature 211, 527 (1966)
150. Painter, R.B., J.E. Cleaver
Repair replication in HeLa cells after large doses of x-irradiation
Nature 216, 369 (1967)
151. Rasmussen, R.E., R.B. Painter
Radiation stimulated DNA-synthesis in cultured mammalian cells.
J. Cell Biol. 29, 11 (1966)
152. Hill, M.
N-S-phase incorporation of ^3H -thymidine into DNA of x-irradiated mammalian cells.
Int. J. Radiat. Biol. 13, 199 (1967)
153. Spiegler, P., A. Norman
Unscheduled DNA synthesis at low x-ray doses
Mutation Res. 10, 379 (1970)
154. Spiegler, P., A. Norman
Kinetics of unscheduled DNA synthesis induced by ionizing radiation in human lymphocytes
Radiat. Res. 39, 400 (1969)
155. Fox, M.S., R. Ayad, B.W. Fox
Characteristics of "repair synthesis" in x-irradiated P 388 F lymphoma cells.
Int. J. Radiat. Biol. 18, 101 (1970)

156. Ayad, S.R., M. Fox
The implication of repair processes in the mechanism of DNA integration by lymphoma cells.
Int. J. Radiat. Biol. 15, 445 (1969)

157. Ayad, S.R., M. Fox
DNA Uptake by a mutant strain of lymphoma cells.
Nature 220, 35 (1968)

158. Petrović, D., A. Ferlevidović, V. Habazin, B. Vuković
New evidence concerning the molecular basis of the restorative effect of DNA in cultured mammalian cells.
Int. J. Radiat. Biol. 18, 243 (1970)

159. Humphrey, R.M., D.L. Steward, B.A. Sedita
DNA-strand breaks and rejoining following exposure of synchronized Chinese hamster cells to ionizing radiation.
Mutation Res. 6, 459 (1968)

160. Fox, B.W., M. Fox
Occurrence of single-strand breaks in the template labelled DNA of P 388 F cells after low doses of electrons.
Int. J. Radiat. Biol. 18, 479 (1970)

161. Lett, J.T., I. Caldwell, C.J. Dean, P. Alexander
Rejoining of x-ray induced breaks in the DNA of Leukaemia cells.
Nature 214, 790 (1967)

162. Ormerod, M.G., U. Stevens
The rejoining of x-ray-induced strand breaks in the DNA of a murine lymphoma cell (L5178Y)
Biochim. Biophys. Acta 232, 72 (1971)

163. Fjelde, A.
Human tumor cells in tissue culture.
Cancer 8, 845 (1955)
164. Eagle, H.
Amino acid metabolism in mammalian cell cultures.
Science 130, 432 (1959)
165. Snow, C., A. Allen
The release of radioactive nucleic acids and mucoproteins by trypsin and ethylenediaminetetra-acetate treatment of baby-hamster cells in tissue culture.
Biochem. J. 119, 707 (1970)
166. H. Fricke, E.J. Hart
"Chemical Dosimetry" in "Radiation Dosimetry"
Ed. F.H. Attix und W.C. Roesch, Vol. II, S. 167
Academic Press, New York und London, 1966
167. Wenzel, M., W. Stöhr
Determination of the incorporation of ^{14}C - or ^3H -
labelled precursors into macromolecules.
Analyt. Biochem. 37, 282 (1970)
168. Marmur, J.
A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms
J. Mol. Biol. 3, 208 (1961)
169. Schmidt, G., S.J. Thannhauser
A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoproteins in animal tissues
J. Biol. Chem. 161, 83 (1945)

170. Kirby, S.
Isolation of DNA from mammalian tissues
Biochim. J. 104, 254 (1967)
171. Coyle, M.B., B.S. Strauss
Search for dark repair in cultured mammalian cells
Genetics 56, 553 (1967)
172. Little, J.B.
Radiation-induced DNA degradation in human cells, lack
of evidence following moderate doses of X-rays
Int. J. Radiat. Biol. 13, 591 (1968)
173. Cleaver, J.E., J.E. Trosko
DNA-degradation products from mammalian cells irradiated
with ultraviolet light
Int. J. Radiat. Biol. 15, 411 (1969)
174. Dalrymple, G.V., J.L. Sanders, M.L. Baker, K.P. Wilkinson
und R.A. Walls
The relation of DNA degradation to the repair of radiation
injury by L cells
Radiat. Res. 40, 112 (1969)
175. Painter, R.B.
Mechanisms of DNA repair in mammalian cells in
Proceedings of the Monaco Symposium, IAEA,
Vienna (1968), Seite 91
176. Berthold, F., M. Wenzel
'Radiochromatographic Counting Techniques' in Instrumentation
in Nuclear Medicine Vol. I, S. 251
Ed. Hine, G.J.
Academic Press N. Y. London 1967

177. Djordjevic, B., R.G. Evans, A.G. Perez, M.K. Weill
Spontaneous unscheduled DNA synthesis in G I HeLa cells
Nature 224, 803 (1969)
178. Witkin, E.M.
Mutation-proof and mutation-prone modes of survival in
derivates of Escherichia coli B differing in sensitivity
to ultraviolet light.
In "Recovery and repair Mechanisms in Radiology", pp.17-55
Brookhaven Symposium in Biology, No. 20 (1967).
179. Cleaver, J.E.
Defective repair replication of DNA in xeroderma pig-
mentosum
Nature 218, 652 (1968)
180. Painter, R.B., J.S. Umber, B.R. Young
Repair replication in diploid and aneuploid human cells
Radiat. Res. 44, 133 (1970)
181. Cleaver, J.E., G.H. Thomas
Single strand interruptions in DNA and the effects
of caffeine in Chinese hamster cells irradiated with
ultraviolet light
Biochem. Biophys. Res. Comm. 36, 203 (1969)
182. Ben-Hur, E., R. Ben-Ishai
DNA repair in ultraviolet light irradiated HeLa cells
and its reversible inhibition by hydroxyurea
Photochem. Photobiol. 13, 337 (1971)
183. Ruth, A.M., B. Barton, C.P.E. Lee
Effects of caffeine on L cells exposed to mitomycin C.
Cancer Res. 30, 2724 (1970)

184. Lytle, C.D.
Host-cell reactivation in mammalian cells
I. Survival of ultraviolet irradiated herpes virus
in different cell lines.
Int. J. Radiat. Biol. 19, 329 (1971)
185. Elkind, M.M., G. F. Whitmore
The radiobiology of cultured mammalian cells
Gordon & Breach New York 1967
186. Sauerbier, W.
Inhibition of host cell reactivation in phage T₁
by caffeine
Biochem. Biophys. Res. Commun. 14, 30 (1964)
187. Sachs, L.
Statistische Auswertungsmethoden, Abschnitt 395
Springer Verlag Berlin-Heidelberg, N.Y. 1968
188. Humphrey, R.M., W.C. Dewey, A. Cork
Relative ultraviolet sensitivity of different phases
in the cell cycle of Chinese hamster cells grown in vitro.
Radiat. Res. 19, 247 (1963)

L e b e n s l a u f

Am 25. 9. 1944 wurde ich als Sohn des Dipl.-Landwirts Dr. rer. nat. Siegfried Landeck und seiner Ehefrau, der Ärztin Dr. med. Benigna Landeck, geb. Lubenau in Widminnen, Krs. Lötzen, Ostpreußen geboren.

Nach der Flucht meiner Eltern wuchs ich in 3185 Velpke, Krs. Helmstedt, auf, wo ich von 1951 bis 1955 die Grundschule besuchte. 1955/56 besuchte ich das Gymnasium in Wolfsburg und ab 1956 das neu-sprachliche Gymnasium in Bad Sachsa, wo ich 1965 das Abitur bestand.

Vom 1.4.1965 bis zum 31.3.1966 war ich Praktikant der Turm-Apotheke in Helmstedt und anschließend bis zum 31.3.1967 Praktikant in der Drömling-Apotheke in Vorsfelde. Am 13.3.1967 bestand ich in Braunschweig das Pharmazeutische Vorexamen.

Im Sommersemester 1967 begann ich am Pharmazeutischen Institut der FU-Berlin das Pharmaziestudium. Im April 1970 bestand ich das Pharmazeutische Staatsexamen.

Im Anschluß an das Staatsexamen führte ich mein pharmazeutisches Studium an der FU fort und begann mit der vorliegenden Dissertation am Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der FU.

In der Zeit vom 1.7. bis 31.12.1971 war ich wissenschaftlicher Assistent am Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der FU-Berlin.

DIFO-DRUCK SCHMACHT - BAMBERG RUF:62216